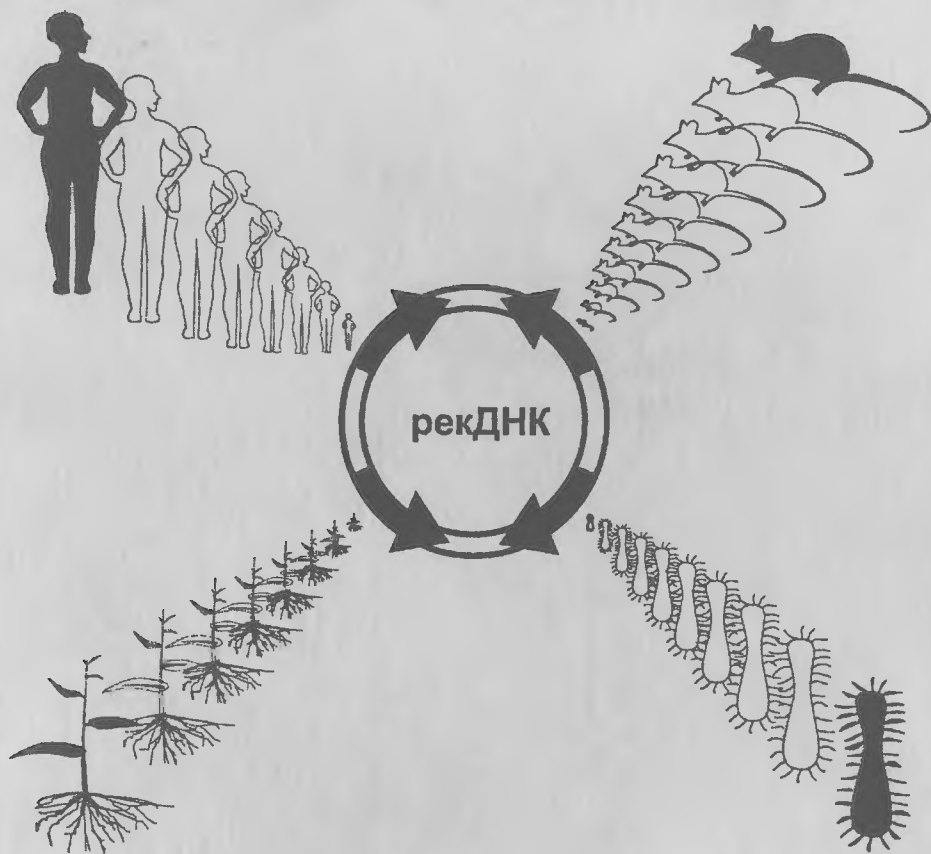


VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

В. Н. Рыбчин



ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД

Терминаторы трансляции

UAA (Ochre)

UAG (Amber)

UGA (Opal)

Второй нуклеотид

Первый нуклеотид (5' -конец)

	U	C	A	G	
U	UUU <i>Phe</i> UUC <i>Phe</i> UUA <i>Leu</i> UUG <i>Leu</i>	UCU <i>Ser</i> UCC <i>Ser</i> UCA <i>Ser</i> UCG <i>Ser</i>	UAU <i>Tyr</i> UAC <i>Tyr</i> UAA <i>Stop</i> UAG <i>Stop</i>	UGU <i>Cys</i> UGC <i>Cys</i> UGA <i>Stop</i> UGG <i>Trp</i>	U C A G
C	CUU <i>Leu</i> CUC <i>Leu</i> CUA <i>Leu</i> CUG <i>Leu</i>	CCU <i>Pro</i> CCC <i>Pro</i> CCA <i>Pro</i> CCG <i>Pro</i>	CAU <i>His</i> CAC <i>His</i> CAA <i>Gln</i> CAG <i>Gln</i>	CGU <i>Arg</i> CGC <i>Arg</i> CGA <i>Arg</i> CGG <i>Arg</i>	U C A G
A	AUU <i>Ile</i> AUC <i>Ile</i> AUA <i>Ile</i> AUG <i>Met</i>	ACU <i>Thr</i> ACC <i>Thr</i> ACA <i>Thr</i> ACG <i>Thr</i>	AAU <i>Asn</i> AAC <i>Asn</i> AAA <i>Lys</i> AAG <i>Lys</i>	AGU <i>Ser</i> AGC <i>Ser</i> AGA <i>Arg</i> AGG <i>Arg</i>	U C A G
G	GUU <i>Val</i> GUC <i>Val</i> GUA <i>Val</i> GUG <i>Val</i>	GCU <i>Ala</i> GCC <i>Ala</i> GCA <i>Ala</i> GCG <i>Ala</i>	GAU <i>Asp</i> GAC <i>Asp</i> GAA <i>Glu</i> GAG <i>Glu</i>	GGU <i>Gly</i> GGC <i>Gly</i> GGA <i>Gly</i> GGG <i>Gly</i>	U C A G

Третий нуклеотид (3' -конец)

Данные по нуклеиновым кислотам

Средний молекулярный вес (М.в.) одной пары нуклеотидных остатков в ДНК (натриевая соль) — 650 дальтон.

1 т.п.н. ДНК кодирует полипептид с М.в. 37000 дальтон (333 аминокислотных остатка).

Полипептид с М.в. 10000 дальтон кодируется 270 п.н. ДНК.

1 пмоль линкера 10 п.н. = 6,6 нг

1 пмоль 1000 п.н. ДНК = 0,66 мкг

1 пмоль ДНК pUC18/19 (2686 п.н.) = 1,77 мкг

1 пмоль ДНК pBR322 (4361 п.н.) = 2,88 мкг

1 пмоль ДНК M13mp18/19 (7250 п.н.) = 4,78 мкг

1 пмоль λ ДНК (48052 п.н.) = 32,01 мкг

1 мкг линкера 10 п.н. = 152 пмоль = $9,1 \times 10^{13}$ молекул

1 мкг 1000 п.н. ДНК = 1,52 пмоль = $9,1 \times 10^{11}$ молекул

1 мкг ДНК pUC18/19 = 0,57 пмоль = $3,4 \times 10^{11}$ молекул

1 мкг ДНК pBR322 = 0,35 пмоль = $2,1 \times 10^{11}$ молекул

1 мкг ДНК M13mp18/19 = 0,21 пмоль = $1,3 \times 10^{11}$ молекул

1 мкг λ ДНК = 0,03 пмоль = $1,8 \times 10^{10}$ молекул

Оптическая плотность A_{260}

Двунитевая ДНК: 1.0 ед. = 50 мкг/мл = 0,15 мМ (в нуклеотидах)

Однонитевая ДНК: 1.0 ед. = 33 мкг/мл = 0,10 мМ (в нуклеотидах)

Однонитевая РНК: 1.0 ед. = 40 мкг/мл = 0,11 мМ (в нуклеотидах)

Молярная концентрация концов ДНК, образованных действием рестриктаз

Кольцевая ДНК: $2 \times (\text{мол. конц. ДНК}) \times (\text{число сайтов})$

Линейная ДНК: $2 \times (\text{мол. конц. ДНК}) \times (\text{число сайтов}) + 2 \times (\text{мол. конц. ДНК})$

Изотопные данные

Изотоп	Период полураспада	Тип излучения
^3H	12,3 года	β
^{14}C	5730 лет	β
^{32}P	14,3 дня	β
^{33}P	25 дней	β
^{35}S	87,4 дня	β
^{125}I	60 дней	γ

Министерство общего и профессионального образования
Российской Федерации

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

В.Н. РЫБЧИН

ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

2-е издание, переработанное и дополненное

Допущено Министерством общего и профессионального
образования РФ в качестве учебника для студентов
биологических специальностей высших учебных заведений

Санкт-Петербург
Издательство СПбГТУ
2002

УДК 575/577

Рецензенты:

кафедра генетики и селекции биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета (чл.-кор. РАН, проф. *С.Г. Инге-Вечтомов*; вед. науч. сотр., доц. *Ю.И. Павлов*);
В.Л. Калинин, д-р биол. наук, проф.

Научный редактор — чл.-кор. РАН, проф. *В.С. Гайцхоки*

Рыбчин В. Н. Основы генетической инженерии. 2-е изд., перераб. и доп.: Учебник для вузов. СПб.: Изд-во СПбГТУ, 2002. 522 с.
ISBN 5-7422-0088-9

В систематической и логической последовательности рассматриваются основные разделы генетической инженерии про- и эукариот. Описываются элементы природной генетической инженерии, лабораторные методы переноса и амплификации генов, пути конструирования организмов с новыми свойствами. На примерах демонстрируется роль генно-инженерных методов в решении фундаментальных проблем молекулярной биологии и генетики, в создании продуцентов биологически активных препаратов.

Предназначается для студентов и аспирантов биологических, биофизических и биотехнологических специальностей высших учебных заведений.

Табл. 22. Ил. 158. Библиогр.: 417 назв.



Печатается при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант 95-04-285756.

© Рыбчин В.Н., 2002

© Санкт-Петербургский государственный
технический университет, 2002

ISBN 5-7422-0088-9

ОТ АВТОРА

Генетическая инженерия является самым эффективным экспериментальным подходом в исследовании фундаментальных проблем биологии гена. Перспективы прикладного использования генетической инженерии столь велики, что генно-инженерные методы взяты на вооружение крупнейшими медико-биотехнологическими фирмами мира. Поэтому с основами генетической инженерии знакомятся специалисты в разных областях биологии, медицины, сельского хозяйства и биотехнологии. Представление о методах генетической инженерии введены в курсы общей генетики на биологических факультетах университетов, в медицинских и сельскохозяйственных вузах, а в соответствующих учебниках генетической инженерии посвящены отдельные разделы. Тем не менее, чтение углубленного курса по генетической инженерии необходимо на кафедрах, готовящих кадры генетиков, биохимиков, биофизиков и медиков для работы в области молекулярной биологии. Этот курс необходим также специалистам в области молекулярной биотехнологии, выпускаемым рядом технических вузов страны.

Зарубежные методические пособия по генетической инженерии достаточно регулярно переводились на русский язык, однако дела с учебной литературой обстоят не столь удовлетворительно. В кратком курсе Уотсона и др. (1986) излагались только общеобразовательные сведения. Отметим с сожалением, что превосходный учебник Оулда и Примроуза (Old, Primrose, 1994), вышедший уже пятым изданием, все еще не доступен российскому студенту. На русском языке в систематическом и последовательном виде генетическая инженерия была представлена только в первом издании этой книги (Минск: Выпущенная школа, 1986), рекомендованной кафедрой генетики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Книга была удостоена 2-й премии на всесоюзном конкурсе учебников в 1988 году. Весь ее тираж (3800 экз.) уже давно разошелся.

Основы генетической инженерии автор начал читать студентам кафедры "Биофизика" Ленинградского политехнического институ-

та (ныне Санкт-Петербургский государственный технический университет) уже в 1974/75 учебном году, вскоре после появления первых работ по рекомбинантным ДНК. Поставленный курс был первым в СССР. Именно на основании многолетнего опыта чтения этого курса было подготовлено первое издание книги. До появления книги С.Н. Щелкунова “Генетическая инженерия”, часть I (Новосибирск: Изд-во НГУ, 1994) она была единственным в России и странах СНГ учебным пособием по этому предмету.

Автору казалось полезным представить генетическую инженерию не только и не просто как набор методических подходов, но и как развитие генно-инженерных “идей”, позаимствованных у природы. В части I на всех уровнях организации живого прослежены элементы генно-инженерного конструирования, используемого природой. Здесь же и, в особенности, в частях II и III изложены возможности лабораторного вмешательства в геном с целью создания клеток (организмов) с заданными свойствами.

Во введении определяется предмет генетической инженерии, а также описываются ее история и достижения. Основной материал курса излагается в трех частях. В части I (“Генная инженерия *in vivo*”) описываются элементы природной генной инженерии на уровне генов, транспозонов, плазмид, фагов и клеток. В части II (“Генная инженерия *in vitro*”) рассматриваются ферменты и векторы, используемые для создания рекомбинантных ДНК, а также методы секвенирования, синтеза и объединения фрагментов ДНК, способы создания банка генов и скрининг рекомбинантных клонов. В части III “Экспрессия чужеродных генов” излагаются проблемы, возникающие при выражении клонируемых генов в бактериях, дрожжах, в растительных и животных клетках. В заключительной главе описываются и обсуждаются прикладные аспекты развития генетической инженерии. В приложении описаны ключевые аналитические методы генетической инженерии, а также необходимые меры безопасности.

Из-за логики изложения книга получилась полифункциональной. На ее содержании и структуре отразилась современная ситуация с учебниками для вузов, особенно в тех областях, которые в настоящее время бурно развиваются. Молекулярная генетика и генетическая инженерия относятся именно к этой категории. Отсюда то дополнительное внимание, которое автор уделил разделу, посвященному генетической инженерии методами *in vivo* (часть I).

Справедливо, что описанные методы, достаточно редко используются, но они составляют логическую ткань всего предмета и именно они дали толчок развитию генетической инженерии. Параллельно автор сознательно старался придать этой части характер дополнительных глав по молекулярной генетике, включив в нее современные данные (за последние 5 лет) в этой области. В то же время в разделе методов *in vitro* изложение более традиционно. Включены только базовые подходы и идеи, не рассмотренными остались многие методы, которые слились с методами молекулярной биологии.

Книга в какой-то степени рассчитана и на систему поствузовского образования, на тех специалистов (в том числе аспирантов), которые имеют лишь поверхностное представление о молекулярно-генетическом аппарате клетки, но намерены работать, используя методы генетической инженерии. Этим объясняется включение достаточно обширного списка ссылок на оригинальные работы.

Поток научных публикаций, основанных на использовании методов генетической инженерии велик, совершенствуются и сами методы. В этих условиях, безусловно, отдельные вопросы не получили в книге достаточно полного освещения. В ряде случаев, возможно, дается не совсем уточненная оценка значимости тех или иных обсуждаемых фактов. Поэтому автор заранее благодарен за любые критические замечания в адрес данной книги.

По сравнению с первым изданием содержание книги полностью переработано, но ее структура осталась практически неизменной. Это указывает на ценность и дальновидность рекомендаций, которые были даны по этому вопросу рецензентами первого издания книги членом-корреспондентом РАН профессором С.В. Шестаковым и профессором С.З. Миндлин.

Автор искренне признателен члену-корреспонденту РАМН профессору В.С. Гайцхоки за тщательный просмотр рукописи и сделанные предложения по улучшению содержания книги. Ценные замечания сделаны членом-корреспондентом РАН профессором С.Г. Инге-Вечтомовым и ведущим научным сотрудником Ю.И. Павловым. Неоценимую помощь оказали многочисленные советы и замечания, высказанные коллегами за прошедшие годы.

Издание осуществлено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований.

ВВЕДЕНИЕ

Общепринятого определения генетической инженерии не существует. Если следовать традиционному пониманию термина “инженерия”, то генетическую инженерию можно трактовать как искусство использовать знания основ и методов молекулярной генетики и молекулярной биологии для конструирования организмов с заданными наследственными свойствами.

История собственно генетической инженерии насчитывает уже более 30 лет. Ее дальняя предыстория уходит корнями в развитие методов классической генетики. Основную роль в начальный период сыграл количественный анализ, введенный Менделем в 60-е годы прошлого столетия в работы по изучению законов поведения наследственных признаков. Он помог выявить главные генетические закономерности и сформулировать понятие о единице наследственности — гене. Тем не менее, вплоть до середины нашего столетия генетические методы оставались формальными, так как молекулярная база законов наследственности и материальная природа генов оставались неизвестными.

Ближняя предыстория генетической инженерии началась более полувека назад с открытия генетической роли ДНК (Avery *et al.*, 1944). Широкое использование в биологии физико-химических методов, введение в практику прецизионных приборов и устройств позволили перейти к анализу генетических структур и функций на молекулярном уровне. Было выяснено строение молекул ДНК (Watson, Crick, 1953) и белка (Pauling, Corey, 1951). Это привело к формированию нового раздела в генетике — молекулярной генетики, достижением которой явилось установление того факта, что гены не только кодируют структуру определенных продуктов (как правило, белков), но и регулируют процесс их синтеза (Jacob, Monod, 1961). Впоследствии был расшифрован генетический код (1961–1966) и выяснено строение элементов, управляющих дей-

ствием прокариотических генов и синтезом белков: промоторов, операторов, сайтов связывания рибосом, терминаторов транскрипции и трансляции и др.

Достойное место в предыстории генетической инженерии занимают работы Жакоба, проведенные в середине 60-х годов. С помощью целенаправленных генетических операций методами рекомбинации *in vivo* он сумел подчинить структурную часть одного оперона регуляторным элементам другого. В то же время в его лаборатории было доказано, что перемещение оперона вместе со всеми собственными регуляторными элементами в другую область хромосомы не отражается заметным образом на его способности к экспрессии (Signer, Beckwith, 1966). Результаты этих экспериментов находятся у истоков генетической инженерии *in vivo* и составляют основу современных методов решения задач по экспрессии клонируемых генов. Важную роль в становлении генетической инженерии сыграло открытие явления специфической трансдукции бактериальных генов некоторыми умеренными фагами (Morse *et al.*, 1956). Оно дало возможность сформировать представление о векторах, т.е. молекулах — переносчиках генов, и подсказало пути извлечения генов из клеточного генома.

Обнаружение явления рестрикции и модификации ДНК у бактерий и раскрытие его механизма (Arber, Dussoix, 1962; Dussoix, Arber, 1962) позволили идентифицировать целый класс рестрицирующих эндонуклеаз (Smith, Wilcox, 1970; Kelly, Smith, 1970), что и открыло путь к разработке технологии рекомбинантных ДНК. Энзимология нуклеиновых кислот предоставила в распоряжение “генных инженеров” обширный “инструментарий” для всевозможных манипуляций с ДНК, а генетика микроорганизмов подсказала им способ введения сконструированных *in vitro* молекул ДНК в реципиентные клетки путем их трансформации. Поэтому в последующие годы методы *in vitro*, позволившие синтезировать, выделять, рекомбинировать и перемещать гены, получили широкое распространение в практике молекулярных генетиков.

Термин “генетическая инженерия” появился на рубеже 70-х годов. В то время впервые был выделен *in vitro* “чистый” ген (лактозный оперон кишечной палочки; Shapiro *et al.*, 1969), а в лаборатории Кораны химическим путем был синтезирован ген алани-

новой тРНК дрожжей (Agarwal *et al.*, 1970). К этому времени эмбриологи достигли значительных успехов в манипулировании зародышевыми клетками животных. Благодаря чему, к примеру, после удаления ядра из яйцеклетки лягушки стало возможным введение в нее ядра клеток кишечной стенки головастика и получение нормального взрослого организма. Так впервые неполowym способом было воспроизведено животное, что позволило клонировать особи, т.е. получать их генетически идентичные копии. Если же исследователю доступны зародышевые клетки и “чистые” гены, то появляется возможность заменить определенные дефектные гены полноценными, т.е. осуществить генную терапию. Именно для этого процесса первоначально был введен термин “генетическая инженерия”. Однако вскоре стало ясно, что с появлением “чистых” генов открывается перспектива конструирования бактерий с несвойственными им признаками, в том числе и высокоэффективных штаммов промышленных микроорганизмов. Поэтому генетической инженерией стали называть комплекс молекулярно-генетических методов, с помощью которых можно осуществлять целенаправленное конструирование организмов путем различных операций над информационными молекулами.

Годом рождения генетической инженерии считают 1972 год, когда в лаборатории Берга была получена *in vitro* первая рекомбинантная молекула ДНК путем объединения линейных фрагментов ДНК с помощью искусственно созданных липких концов (Jackson *et al.*, 1972). В следующем году было показано, что можно объединять фрагменты ДНК с липкими концами, образовавшимися после обработки ДНК некоторыми рестрицирующими эндонуклеазами (Lobban, Kaiser, 1973). Это послужило толчком для бурного развития генетической инженерии. Были сконструированы первые плазмидный (Cohen *et al.*, 1973) и фаговый (Murray, Murray, 1974) векторы, разработаны новые методы объединения (рекомбинации) молекул ДНК *in vitro*, выявлены основные закономерности экспрессии генов в чужеродном окружении.

Развитию генетической инженерии способствовало и постоянное совершенствование биофизической аппаратуры — ультра- и микроцентрифуг, спектрофотометров, жидкостных сцинтилляционных счетчиков, аминокислотных анализаторов, секвенаторов и

синтезаторов пептидов и олигонуклеотидов, различных устройств для хроматографии, гель-электрофореза, полимеразной цепной реакции, радиоиммунного анализа, сканирования гелей и т.д.

Генетическую инженерию можно рассматривать как состоящую из двух разделов — генной и геномной инженерии (таблица).

Разделы генетической инженерии

<i>Генная инженерия</i>			
Содержание	Этапы	“Инструментарий”	Методы переноса генов
Конструирование организмов с несвойственными данному виду признаками	<i>In vivo</i> : извлечение генов, их перенос и закрепление в новом генетическом окружении, экспрессия генов	Вирусы, плазмиды и транспозоны	Трансдукция, конъюгация, транспозиция, слияние протопластов
	<i>In vitro</i> : синтез или выделение генов; модификация генов, замена промоторов и терминаторов, локализованный мутагенез; присоединение генов к векторным молекулам; введение генов в клетки, их клонирование и экспрессия	Рестриктазы и другие нуклеазы, ДНК-лигазы, обратная транскриптаза и другие ДНК- и РНК-полимеразы. Векторы, адаптеры, полинкеры, зонды и т.д.	Трансформация (химическая, электропорация, ускоренными частицами, липосомами), микроинъекция в ядра эукариот
<i>Геномная инженерия</i>			
Содержание	Объект	Методы конструирования	
Конструирование организмов новых видов	Вирусы	Рекомбинация <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	
	Клетки прокариот	Межвидовая конъюгация и слияние протопластов	
	Клетки эукариот	Слияние растительных протопластов и животных клеток, введение в клетки изолированных метафазных хромосом, микроинъекция хромосом в ядра, перенос изолированных митохондрий и хлоропластов	

Генная инженерия методами *in vivo* или *in vitro* решает задачи введения в геном реципиентной клетки одного или нескольких (обычно чужеродных) генов либо создания в геноме новых типов регуляторных связей. В таких случаях видовая принадлежность реципиентных организмов не меняется, но появляются несвойственные им признаки.

Перед геномной инженерией стоят задачи более глубокого вмешательства в геном, вплоть до создания новых видов организмов. Методы решения таких задач различны для вирусов и для про- и эукариотических клеток.

Часто генетическую инженерию сводят лишь к операциям с молекулами ДНК методами *in vitro*. Такое сужение области генетической инженерии вряд ли оправдано, поскольку ее конечным результатом является конструирование рекомбинантных молекул ДНК и метод здесь не имеет значения. Нет, например, никакой принципиальной разницы между трансдуцирующими фагами, полученными методами *in vivo* и *in vitro*: в обоих случаях целенаправленно конструируются или отбираются фаги с заданными свойствами. Во многих экспериментах с клетками высших эукариот результат достигается только последовательными операциями *in vivo* и *in vitro*.

Методы генетической инженерии успешно применяются для решения фундаментальных проблем. Решающее значение они имеют для исследования молекулярной структуры геномов и генов, а также молекулярных механизмов регулирования их экспрессии. Уже на начальных этапах их применения удалось достигнуть существенного прогресса при изучении эукариотических организмов. Был установлен факт прерывного строения генов, выявлены мобильные диспергированные гены, поняты основные механизмы переключения генов при дифференцировке клеток, определена структура многих регуляторных элементов на уровне ДНК, в отдельных случаях выяснены генетические причины злокачественного перерождения клеток и т.д. Генетическая инженерия способствовала становлению новых научных направлений, составляющих базу молекулярной медицины: молекулярной вирусологии, молекулярной онкологии, молекулярной нейрофизиологии и т.д.

Существенных успехов генетическая инженерия достигла и при решении прикладных задач, дав толчок зарождению

молекулярной биотехнологии. Уже в конце 70-х годов в клетках кишечной палочки был осуществлен синтез ряда животных и человеческих белков и гормонов — соматостатина (Itakura *et al.*, 1977), проинсулина (Villa-Komaroff *et al.*, 1978), гормона роста (Martial *et al.*, 1979). Теперь же список генно-инженерных продуктов включает в себя сотни наименований лекарственных и других полезных препаратов.

В первые годы основными объектами генно-инженерных экспериментов были клетки *Escherichia coli* K-12, а также ее плазмиды и бактериофаги, так как именно они были наиболее полно изучены генетически. Это позволяло целенаправленно конструировать новые типы векторных молекул и реципиентных клеток, а также прогнозировать свойства рекомбинантных молекул ДНК и проводить их анализ. Но со временем были разработаны системы клонирования для различных промышленно важных микроорганизмов, а также для клеток растений и животных. В настоящее время можно получать растения и животных, содержащих в своем геноме любой избранный ген. Успех работы зависит только от суммы вложенных в нее средств.

Молекулярная биология и генетическая инженерия тесно переплетены друг с другом и в приложениях к медицине. Задача ученых — так изучить организм, чтобы понять болезнь в молекулярных терминах, выявить вещества, создающие проблему и дать рекомендации для лечения недуга. Выполнение этих рекомендаций возлагается на “генных инженеров”. Они создают продуценты активных человеческих белков, выделяют или конструируют молекулы, снимающие проблему.

Ярким примером успехов в этой области является фирма “Генетех”. Созданная на скромные инвестиции в 1976 г. при участии Г. Бойера — одного из пионеров генетической инженерии, она сейчас занимает лидирующие позиции в создании препаратов медицинского назначения. Уже в 1977 году сконструирован штамм *E. coli*, синтезирующий человеческий белок (somatostatin). В 1978 году клонирован ген человеческого инсулина, в 1979 году — ген человеческого гормона роста. Тщательная процедура клинической проверки генно-инженерных продуктов позволила уже в 1982 году получить разрешение на использование для лечения рекомбинант-

ного инсулина. Этот инсулин незаменим для больных диабетом, у которых обычно применяющийся свиной или бычий инсулин вызывает аллергические реакции. В 1984 г. налажено производство антитромбогенного фактора VIII. В дальнейшем были разработаны технологии синтеза других медицинских препаратов и получены разрешения на использование:

1985 г. — человеческого гормона роста для детей с дефицитом этого гормона;

1986 г. — интерферона-альфа-2а для лечения некоторых типов лейкомии;

1987 г. — тканевого активатора плазминогена для удаления тромбов у пациентов с острым инфарктом миокарда;

1990 г. — интерферона-гамма-1b для лечения хронической грануломы; тканевого активатора плазминогена при острой эмболии легких; вакцины против гепатита В;

1993 г. — гормона роста для лечения нарушений в росте у детей с хронической почечной недостаточностью; пульмозима для лечения муковисцидоза; фактора VIII для лечения больных гемофилией А;

1996 г. — гормона роста для инъекций при лечении нарушений в росте у детей с хронической почечной недостаточностью; тканевого активатора плазминогена при острых приступах ишемической болезни сердца или спазмах сосудов головного мозга; человеческого гормона роста для лечения недостатка в росте, связанного с синдромом Тернера; пульмозима для лечения запущенных форм муковисцидоза;

1997 г. — ритуксана для лечения пациентов с лимфомой не-Ходжкина; гормон роста для лечения дефицита гормона роста у взрослых;

1998 г. — моноклональных антител для терапии пациентов с определенным типом метастазирующего грудного рака.

ЧАСТЬ I

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ *IN VIVO*

Идеи генной инженерии *in vivo* почерпнуты из природных молекулярно-генетических явлений, связанных с перемещением отдельных генов, их групп или сегментов. Эти явления можно отнести к природной генетической инженерии. Они встречаются на разных иерархических уровнях — от генных сегментов до клеток. Напомним о внутригенных перестройках генов иммуноглобулинов при дифференцировке лимфоцитов, что обуславливает образование разнообразных антител; о транспозонах — подвижных генетических элементах, переносящих адаптивно полезные признаки и вызывающих внутригеномные перестройки; о транслокации отдельных клеточных генов в вирусные геномы, что придает вирусам онкогенные свойства; о переносе бактериальных генов плазмидами и фагами; о сайт-специфических инверсиях ДНК, контролирующих выражение генов и приводящих к изменению фенотипа клеток и т. д.

Содержание части позволяет: во-первых, познакомить читателя с молекулярно-биологическими свойствами основных объектов генно-инженерных операций — генов, транспозонов, плазмид, вирусов и клеток; во-вторых, привлечь внимание к явлениям природной генетической инженерии, в частности к фактам горизонтального переноса генов, и показать возможность их целенаправленного лабораторного использования для изменения генетических свойств вирусов и клеток, что и составляет суть генной инженерии *in vivo*. В этом плане полезные сведения можно почерпнуть в пособиях Девис и др., 1984; “Плазмиды. Методы”, 1990; Miller, 1992, а, б.

Глава 1

ГЕНЫ

Основными объектами генно-инженерных операций являются гены — участки ДНК или РНК, детерминирующие последовательность мономерных звеньев в кодируемых ими полипептидах или полинуклеотидах. В генетической инженерии обычно манипулируют генами, кодирующими полипептиды (белки), поэтому здесь не будут рассматриваться гены, которые определяют синтез рРНК или тРНК.

За последние годы представления о структуре генов заметно усложнились. На раннем этапе развития молекулярной генетики предполагалось, что гены состоят из непрерывной кодирующей последовательности нуклеотидов. Однако позднее выяснилось, что большинство генов эукариот и некоторые прокариотические гены имеют мозаичное строение — в них чередуются кодирующие и некодирующие области. Поэтому они значительно длиннее, чем это требуется для кодирования белков заданной длины. Например, ген дигидрофолатредуктазы мыши включает 32 тысячи пар нуклеотидов (т.п.н.), в то время как его кодирующая область — только 568 пар нуклеотидов (п.н.). Считалось также, что гены в ДНК занимают фиксированное положение. Теперь же выявлено много “блуждающих” генов и даже их групп.

Информация, содержащаяся в генах, записана в виде генетического кода. У всех организмов, за исключением некоторых кодонов у ресничных простейших и в митохондриях, он одинаков. Одинаковы у всех клеток и принципы реализации генетической информации. В структуре любого гена запрограммированы два основных этапа его экспрессии. На этапе транскрипции с помощью РНК-полимеразы синтезируется мРНК. Нуклеотидные последовательности, благодаря которым РНК-полимераза связывается с

ДНК (промоторы) и отсоединяется от нее (терминаторы транскрипции), располагаются в начале и конце генов, соответственно. На этапе трансляции осуществляется синтез белка. Генетические сигналы, обуславливающие этот процесс, также заложены в структуре генов: в начале и конце их белок-кодирующих областей расположены иницирующие и терминирующие кодоны.

Несмотря на принципиальное сходство этих этапов у всех организмов, структура генов и их регуляторных элементов, а также строение аппаратов транскрипции и трансляции у про- и эукариот существенно различаются (табл. 1.1).

Таблица 1.1

Характеристика генетического аппарата про- и эукариот

Элементы аппарата	Прокариоты	Эукариоты
	<i>Гены</i>	
Строение Стабильность Координация экспрессии	Непрерывны Стабильны Гены, выполняющие общую функцию, сгруппированы в опероны (регулоны)	Обычно содержат интроны Возможны перестройки Оперонов нет. У индуцибельных генов имеются регуляторные элементы. Тканеспецифичность энхансеров
	<i>Транскрипция</i>	
Число РНК-полимераз	Одна, распознает промотор с помощью σ -субъединицы	Три, распознают промотор с помощью транскрипционных факторов
Промоторы	Единый план строения; наличие двух консервативных последовательностей: у <i>E. coli</i> TATAAT (–10) и TTGACA (–35)	Промоторы генов, кодирующих белки, имеют одну консервативную ТАТА-последовательность, а также мозаичный набор из разных боксов. У высших эукариот: CAAT, GC, октамер ATTTGCAT и др.
Терминатор транскрипции	GC-богатая шпилька в мРНК и затем последовательность из уридиновых остатков. Иногда зависит от факторов терминации	Сайт AAUAAA в конце мРНК является сигналом для отщепления концевой части транскрипта и полиаденилирования мРНК.

Окончание табл. 1.1

Элементы аппарата	Прокариоты	Эукариоты
мРНК	Коллинеарна гену или оперону	Первичный транскрипт коллинеарен гену; на 5'-конце находится 7-метилгуанозин, а на 3'-конце — полиадениловая цепочка. "Зрелая" мРНК образуется в процессе сплайсинга. Возможны варианты за счет альтернативного сплайсинга
Рибосомы	<i>Трансляция</i> 70S (50S + 30S)	80S (60S + 40S)
Сайт связывания рибосом	Последовательность с ядром AGGA и первые кодоны гена	Посадка малой субъединицы опосредована кэп-сайтом. Сборка целой рибосомы происходит на сайте GCC(A/G)*CCAUGG, включающем иницирующий кодон
Иницирующие кодоны	AUG, изредка GUG или UUG	AUG
Терминирующие кодоны	UAG, UAA, UGA	UAG, UAA, UGA

* Здесь и далее в скобках через косую черту указаны альтернативные нуклеотидные остатки.

ГЕНЫ ПРОКАРИОТ

Основные молекулярно-генетические сведения, касающиеся прокариот, получены при изучении клеток *Escherichia coli*.

Транскрипция. Индивидуально работающий ген прокариот состоит из трех обязательных элементов: промотора, белок-кодирующей области и терминатора транскрипции (рис. 1.1). Координаты транскрибируемых нуклеотидов принято записывать с положительным знаком, а нуклеотидов промоторов — с отрицательным. Отсчет нуклеотидов в генах ведут от первого транскрибируемого нуклеотида, обозначаемого +1.

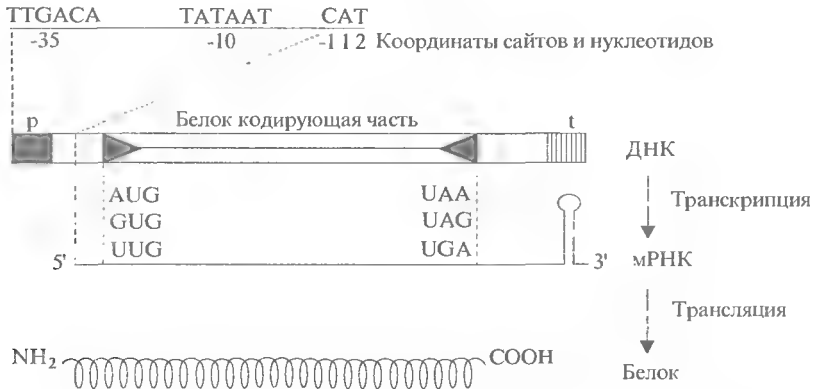


Рис. 1.1. Структура гена прокариот и этапы его экспрессии.

Приведены последовательности нуклеотидов в консервативных участках промотора и в стартовом сайте транскрипции. На мРНК указаны возможные иницирующие и терминирующие кодоны. р — промотор; t — терминатор транскрипции; ► — иницирующий кодон; ◄ — терминирующий кодон

Транскрипцию у бактерий ведет общая для всех генов РНК-полимераза, состоящая из 5 субъединиц: двух α и по одной β , β' и σ . Распознавание промоторов РНК-полимеразой осуществляется с помощью ее σ -субъединицы. У клеток *E. coli* известно 6 различных σ -субъединиц и, соответственно, 6 разных типов промоторов. Они используются для дифференцированной транскрипции определенных групп генов, имеющих промоторы сходного строения. Субъединица σ^{70} (цифровой индекс обозначает ее массу в килодальтонах) участвует в транскрипции подавляющего большинства генов, другие σ -субъединицы — в специальных случаях (табл. 1.2).

Все промоторы имеют две консервативные последовательности. Одна из них необходима для узнавания, а другая — для тесного связывания промотора с РНК-полимеразой. В стандартном промоторе, распознаваемом субъединицей σ^{70} , первая последовательность с консенсусом TTGACA (здесь и далее последовательность нуклеотидов указывается в направлении 5'→3') центрируется около координаты -35, а вторая (консенсус TATAAT) — около отметки -10 от старта транскрипции. Положения обеих последовательностей в стандартных промоторах несколько различаются, но в

90 % случаях они разделяются 16—18 п.н. 3'-концевой нуклеотид последовательности –10 отстоит от первого транскрибируемого нуклеотида в среднем на расстоянии 6—7 п.н. Первым транскрибируемым нуклеотидом у генов *E. coli* в половине случаев является дезоксиаденозин. Соседние с ним нуклеотиды представлены в основном дезоксицитидином (координата –1) и тимидином (координата +2). Локализация консервативных последовательностей в нестандартных промоторах иная, но для единообразия их также обозначают — –35 и –10.

Таблица 1.2

**Сигма-субъединицы РНК-полимеразы *E. coli* и структура
распознаваемых ими промоторов**

Субъ- единица	Ген	Консенсус в боксе –35	Консенсус в боксе –10	Число п.н. между боксами	Назначение субъединиц
σ^{70} σ^{54}	<i>rpoD</i> <i>rpoN</i>	TTGACA CTGGNA	TATAAT TTGCA	16–18 6	Общее Ассимиляция азота
σ^{38}	<i>rpoS</i>				Окислительный стресс
σ^{32} σ^{28}	<i>rpoH</i> <i>fliA</i>	CCCTTGAA CTAAA	CCCGATNT GCCGATAA	3–15 15	Тепловой шок Флагеллы, хемотаксис
σ^{24}	<i>rpoE</i>				Сверхтепловой шок

Сигналами завершения синтеза мРНК являются терминаторы транскрипции (см. обзор Friedman *et al.*, 1987), информация о которых содержится, конечно, в ДНК, но их пространственная структура складывается и функционирует на синтезируемой мРНК. Для большинства генов *E. coli* наличие этих сигналов достаточно для терминации транскрипции, но некоторые бактериальные и многие фаговые гены требуют присутствия дополнительного фактора — Rho. Rho-независимые терминаторы имеют два характерных участка. Первый участок содержит инвертированные GC-богатые последовательности нуклеотидов разной протяженности, образующие в мРНК шпильки длиной 7—20 п.н. Через 7—9 нуклеотидов после шпильки находится второй участок, состоящий приблизительно

из 6 уридиновых остатков (рис. 1.2). На первом участке движение РНК-полимеразы по ДНК замедляется и даже останавливается, а на втором — РНК-полимераза отсоединяется от ДНК. Характерной особенностью Rho-зависимых терминаторов является наличие шпильки и обогащенность (до 40 %) концевой участка транскрипта длиной 50–90 нуклеотидов цитидиловыми остатками и его обедненность (до 15 %) гуанидиловыми остатками. В таких участках Rho-фактор связывается с мРНК, двигаясь вдоль нее, догоняет РНК-полимеразу, “застывшую” на шпильке, и способствует ее отсоединению от ДНК. Подобные структуры (С-богатый — G-бедный участок с последующей шпилькой) встречаются и в середине генов, но в этом случае действию Rho-фактора препятствуют рибосомы, осуществляющие синтез белка.

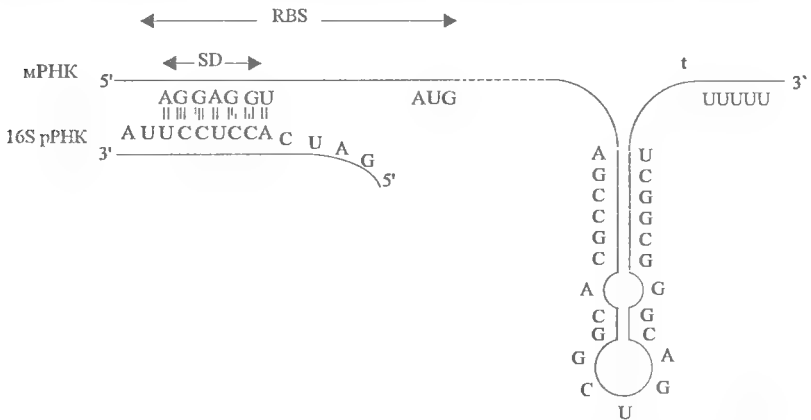


Рис. 1.2. Строение сайта связывания рибосом (RBS) и Rho-независимого терминатора транскрипции (t) *E. coli*.

SD — последовательность Шайна–Далгарно

Трансляция. Образовавшиеся в процессе транскрипции генов мРНК состоят из лидерной (5'), белок-кодирующей и концевой (3') частей. Трансляция гена начинается с посадки рибосом на участок RBS (ribosome binding site), находящийся в лидерной части мРНК. Эффективность связывания рибосом (и, соответственно, трансляции) зависит от двух факторов. Во-первых, важно наличие в нем последовательности нуклеотидов, комплементарной 3'-концу

16S рРНК и находящейся на расстоянии 4—8 нуклеотидов от иницирующего кодона AUG. Эту часть мРНК называют последовательностью Шайна—Далгарно (SD-последовательность). Она состоит из 5—9 нуклеотидов, ядром которых является последовательность AGGA (см. рис. 1.2). Во-вторых, существенно отсутствие в лидерной части мРНК шпильчатых структур, затрудняющих посадку рибосом. Поэтому строение сайта связывания рибосом RBS индивидуально для каждого гена, так как, кроме SD-последовательности, он включает в себя несколько начальных кодонов.

Белок-кодирующая часть мРНК ограничена иницирующим (обычно — AUG, реже — GUG или UUG) и терминирующими (UAA, UAG и UGA) кодонами. Триплет AUG кодирует метионин, но в начале синтезируемой полипептидной цепочки он определяет постановку измененной аминокислоты — формилметионина. В готовом белке эта аминокислота деформируется или вообще отщепляется.

Регуляция. Экспрессия вышеописанного гена конститутивна, т. е. она не регулируется. Регуляция экспрессии генов прокариот осуществляется в основном на уровне транскрипции с помощью регуляторных белков. В этом случае регулируемые гены содержат рядом с промотором дополнительные элементы, т. е. специфические нуклеотидные последовательности, способные связывать регуляторные белки. Регуляция может быть негативной (осуществляется белками-репрессорами) или позитивной (осуществляется белками-активаторами). В названии способа регуляции отражен тот факт, что в первом случае экспрессия гена подавляется при появлении в клетке активного белка-регулятора, а во втором — она без него невозможна (рис. 1.3).

Синтез белков-регуляторов является конститутивным. В обоих случаях активными они либо синтезируются сразу, либо становятся после присоединения к ним определенных для каждого гена низкомолекулярных веществ. Если появление в клетке такого вещества приводит к инициации транскрипции, то его называют индуктором, а сам ген — индуцируемым. Если же ситуация обратная, то вещество называют корепрессором, а ген — репрессируемым.

При негативной регуляции перед геном, перекрываясь с промотором, расположен оператор, предназначенный для связывания

молекул репрессора. В случае неактивного состояния репрессора РНК-полимераза эффективно связывается с промотором. Активный репрессор своей посадкой на оператор мешает этому связыванию, выключая тем самым экспрессию гена. В случае позитивной регуляции регуляторная последовательность, с которой связывается активатор, примыкает к промотору. Посадка РНК-полимеразы на промотор возможна только после ее контакта на ДНК с активатором. Нюансированию регуляции способствует наличие у некоторых генов одного-двух дополнительных промоторов, один из которых обеспечивает некоторый базальный уровень экспрессии гена, а транскрипция с другого (других) начинается при появлении в клетке определенных сигналов. Так, например, устроены гены, кодирующие индуцибельную систему репарации ДНК.

А. Негативный контроль



Б. Позитивный контроль



Рис. 1.3. Схемы негативного (А) и позитивного (Б) контроля экспрессии генов

В случае совместного выполнения несколькими белками определенной функции кодирующие их гены составляют группу с координированной экспрессией. Если входящие в такую группу

гены располагаются рядом, то группу называют опероном, если в разных местах — регулоном. Координация экспрессии генов в оперонах или регулонах достигается одновременным включением или выключением транскрипции этих генов.

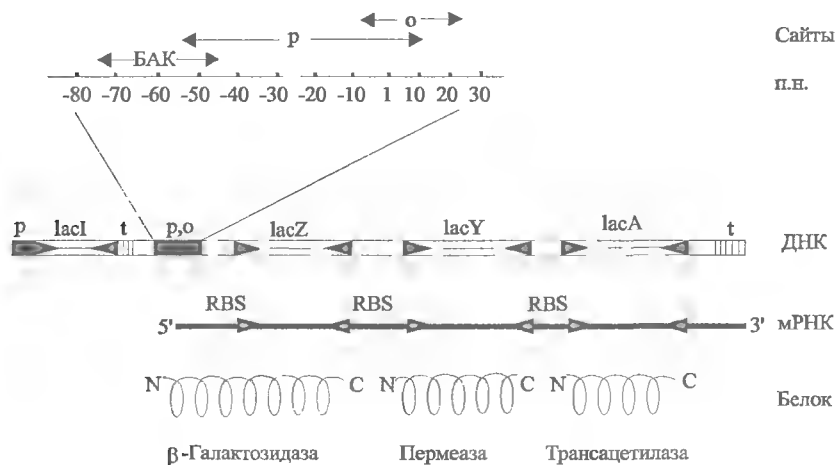


Рис. 1.4. Лактозный оперон и этапы его экспрессии.

p — промотор; o — оператор; t — терминатор транскрипции;
RBS — сайт связывания рибосом; БАК — сайт для связывания комплекса сАМР—БАК;

► — иницирующий кодон; ◄ — терминирующий кодон

Со строением оперонов и принципом регуляции экспрессии входящих в них генов можно ознакомиться на примере лактозного оперона (рис. 1.4). Этот оперон состоит из трех генов — *lacZ*, *lacY* и *lacA*, продукты которых — β-галактозидаза, β-галактозидпермеаза и β-галактозидтрансацетилаза, соответственно, — необходимы для использования лактозы в качестве источника углерода. Оперон имеет один промотор и перекрывающийся с ним оператор, а также один основной терминатор транскрипции, поэтому все входящие в него гены транскрибируются в одну полигенную молекулу мРНК. На ней одновременно синтезируются все три белка, так как каждый входящий в нее ген обладает собственным сайтом связывания рибосом. Одновременно при необходимости прекращается и экспрессия всех генов оперона, что осуще-

ствляется путем посадки молекул репрессора на оператор. Ген *lacI* репрессора лактозного оперона, расположенный рядом, экспрессируется конститутивно, так что в отсутствие лактозы оперон не функционирует (негативная регуляция). Замена сахаров в среде на лактозу приводит к дерепрессии (индукции) оперона, так как она обладает способностью связываться с репрессором и инактивировать его. Таким образом, лактоза является индуктором *lac*-оперона.

Лактозный оперон является объектом и позитивной регуляции, осуществляемой с помощью другого сайта, который находится рядом с промотором и одинаков для всех оперонов, подвергающихся катаболитной репрессии. Это явление заключается в следующем. Если в среде присутствуют одновременно глюкоза и какие-нибудь другие сахара, то бактерии используют только глюкозу. Индикатором отсутствия в клетке глюкозы является высокая концентрация циклического АМР (сАМР), обладающего способностью связываться с белком-активатором катаболизма сахаров (БАК). Комплекс же сАМР—БАК имеет высокое сродство с сайтом позитивной регуляции оперонов, предназначенных для катаболизма сахаров (БАК-сайт). РНК-полимераза связывается с относительно слабыми промоторами этих оперонов только во взаимодействии с указанным комплексом, поэтому их транскрипция происходит только в отсутствие глюкозы (табл. 1.3).

Таблица 1.3

Влияние на экспрессию лактозного оперона состояний его сайтов при катаболитной репрессии

Сахара		Сайты			Экспрессия
Лактоза	Глюкоза	БАК	Промотор	Оператор	
+	+	с	с	с	—
+	—	з	з	с	+
—	+	с	с	з	—
—	—	з	с	з	—

(+) — есть; (—) — нет; з — занят; с — свободен.

Сходный принцип регуляции экспрессии осуществляется и в регулонах, только здесь каждый ген обладает собственным промотором и оператором. В некоторых регулонах часть генов объединена в опероны. Например, аргининовый регулон состоит из

6 отдельных генов и 2 оперонов. В начале каждого из них находится консервативная последовательность из 18 п.н., которая и служит оператором.

Регуляция экспрессии оперонов, обеспечивающих синтез каких-либо низкомолекулярных веществ (например, аминокислот), обычно осуществляется конечными продуктами, которые выступают в данном случае как корепрессоры. По достижении определенной концентрации эти продукты объединяются с молекулами репрессоров, способствуя тем самым их связыванию с операторами и блокированию транскрипции оперонов. Некоторые опероны, определяющие синтез аминокислот, дополнительно регулируются с помощью так называемых аттенуаторов.

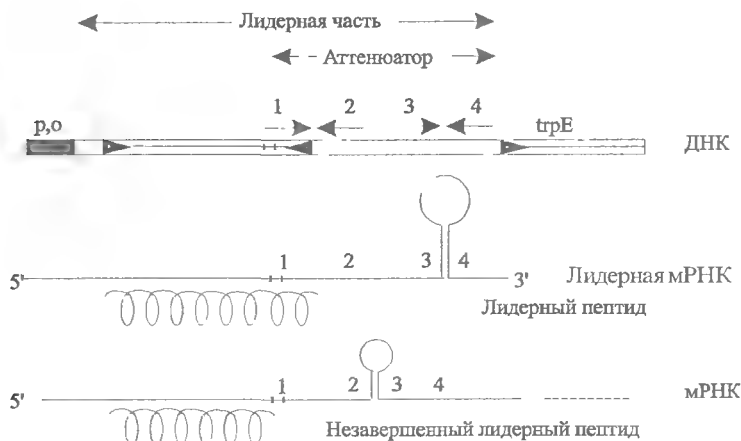


Рис. 1.5. Механизм аттенуации триптофанового оперона.

p — промотор; o — оператор; ► — иницирующий кодон; ◄ — терминирующий кодон; ■ — триптофановый кодон; 1, 2, 3, 4 — участки, принимающие участие в образовании шпилек

Рассмотрим принцип их действия на примере триптофанового оперона. Аттенуатор располагается в лидерной части оперона, т. е. между промотором и первым геном. Он представляет собой нуклеотидную последовательность с двумя гомологичными инвертированными повторами, так что шпильки могут образовываться участками 1 и 2, 2 и 3, 3 и 4, причем шпилька 3:4 является терминатором транскрипции (рис. 1.5), а ее образованию препят-

ствуется шпилька 2:3. Лидерная последовательность транскрибируется в лидерную РНК, содержащую информацию о лидерном пептиде. В участке 1 находятся подряд два триптофановых кодона, а между участками 1 и 2 расположен терминирующий кодон. Поэтому от наличия или отсутствия в среде триптофана зависит степень завершенности синтеза лидерного пептида, что в свою очередь отражается на вторичной структуре лидерной РНК. В присутствии триптофана завершение синтеза лидерного пептида сопровождается передвижением рибосом в участок 2. Это способствует образованию шпильки 3:4, благодаря чему аттенуатор приобретает свойства терминатора транскрипции и триптофановая мРНК не образуется. В противном случае рибосомы “застревают” в участке 1 и по кинетическим причинам шпилька 2:3 образуется предпочтительнее, чем 3:4. Поэтому РНК-полимераза продвигается за аттенуатор и образует полноразмерный транскрипт оперона.

Регуляция на уровне трансляции встречается реже, чем на уровне транскрипции. В этом случае заметную роль играют трансляционные репрессоры. Одним из примеров являются антисмысловые РНК (асРНК). Случаи их использования в качестве регуляторов экспрессии генов и репликации геномов будут рассмотрены в гл. 2–4. асРНК транскрибируется, как правило, с начальной части регулируемого гена (не более 200 п.н.), но с другой нити. Она не является матрицей для синтеза белка. Ее роль — образовать дуплекс на 5'-конце мРНК и тем самым предотвратить ее трансляцию. Другой пример — посадка некоторых белков при их избыточной концентрации на участки мРНК, содержащие инициаторы трансляции. Так, ДНК-полимераза фага Т4 связывается с SD-последовательностью собственного гена, белок оболочки фага R17 связывается с сайтом связывания рибосом гена репликазы того же фага и т. д.

Молекулу ДНК нельзя рассматривать только как пассивное хранилище генетической информации, которая записана в линейной форме и реализация которой находится под контролем регуляторных белков и сайтов. В последние годы было показано, что изгибы в структуре ДНК, присущие самой молекуле или вызванные посадкой на нее белков, играют активную роль в регуляции клеточных процессов (см. обзор Perez-Martin *et al.*, 1994).

В частности, изгибание промоторов при посадке на них РНК-полимеразы является дополнительным уровнем регуляции эффективности транскрипции, чувствительным к физиологическому состоянию клетки.

Таким образом, опероны и многие гены функционируют и регулируются независимо друг от друга. Поэтому, меняя их локализацию в геноме или перенося в другие клетки, можно добиваться их экспрессии. Иногда же гены нельзя физически разделить, так как последовательности нуклеотидов, из которых они состоят, частично или полностью перекрываются, что особенно часто встречается в геномах небольших размеров (ДНК мелких бактериофагов, транспозонах и т. п.). Это позволяет экономить генетический материал. Классическим примером служит бактериофаг ϕ X174. Его однонитевая ДНК, состоящая из 5386 нуклеотидов, должна бы кодировать белки, суммарная молекулярная масса которых составляет около 200 килодальтон (кДа), но фактическая молекулярная масса его белков — почти 240 кДа. Наиболее показательной в плане рационального использования ДНК является область около гена *A* этого фага (рис. 1.6).

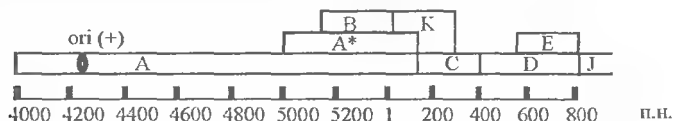


Рис. 1.6. Часть генома фага ϕ X174 в области гена *A*

В гене *A* полностью располагаются гены *A** и *B*, частично — ген *K* (другая его часть находится в гене *C*) и *ori*-сайт начала синтеза положительной нити фаговой ДНК. Гены *B* и *K* транслируются в иной рамке по сравнению с трансляцией гена *A*, а ген *A** — в той же, но с другого иницирующего кодона. Строго говоря, ген *C* также перекрывается геном *A*, поскольку на их стыке имеется последовательность из четырех нуклеотидов АТГА. Три первых являются иницирующим кодоном для белка *C*, а три последних — терминирующим кодоном для белков *A* и *A**. Такая же последовательность нуклеотидов с аналогичной функцией имеется на стыке генов *C* и *D*, т. е. эти гены тоже перекрываются. Ген *E* полностью располагается в гене *D*. Их концевые части устроены следующим образом:

Эволюционно связанные гены, обладающие высокой степенью физической гомологии, образуют семейства. Белки, кодируемые такими генами, действуя одновременно или на разных этапах развития организма, выполняют одинаковые функции. Например, состав белков в α - и β -цепях гемоглобина крови млекопитающих различен у эмбриона, плода и взрослого организма, что вызвано дифференциальной экспрессией генов, входящих в α - и β -семейства глобиновых генов. Наряду с функционирующими генами, в семействах обнаружены нефункционирующие. Такие гены получили название псевдогенов. Они не экспрессируются по различным причинам (изменение рамки считывания из-за делеции или вставки, отсутствие интрона и т. п.).

Характерной чертой генов, входящих в семейство, является сходная картина локализации большинства интронов. Это сходство не ограничивается рамками определенного генома. Так, в случае глобиновых генов сходными по расположению интронов оказались гены у всех исследованных животных — у млекопитающих, птиц и лягушек. Однако длины и нуклеотидные последовательности интронов могут значительно варьировать, меняя тем самым и размеры самих генов.

Транскрипция. Гены эукариот не группируются в опероны, поэтому каждый из них имеет собственные промотор и терминатор транскрипции (рис. 1.7). Транскрипцию ведут три различные РНК-полимеразы: I, II и III, которые синтезируют рРНК, мРНК и тРНК, соответственно. Как и в случае прокариот, рассмотрим только механизм экспрессии генов, кодирующих белки. Поэтому далее под эукариотической РНК-полимеразой подразумевается РНК-полимераза II. Она состоит из более десятка субъединиц, но все же связываться непосредственно с промотором не может. Ее посадке на промотор способствуют транскрипционные факторы белковой природы. Ряд из них распознают специфические последовательности (боксы) в промоторе.

Длина типового промотора высших эукариот — около 100 п.н. В нем следует различать две части — базовую и дополнительную. Гены, имеющие только базовую часть промотора, функционируют в любых клетках организма и не подвержены ткане-специфическому контролю. Эта часть служит для инициации транскрипции и

точной ориентации РНК-полимеразы II относительно первого транскрибируемого нуклеотида. Дополнительная часть совместно с энхансерами (см. с. 31) используется для повышения эффективности транскрипции и регуляции активности гена.

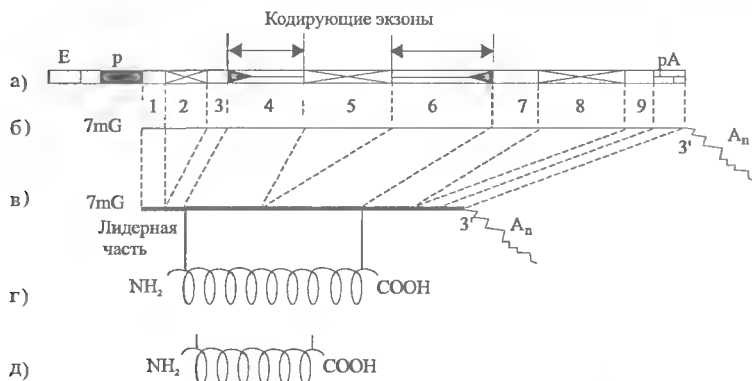


Рис. 1.7. Строение эукариотического гена и этапы его экспрессии: а — принципиальная структура мозаичного гена; б — пре-мРНК; в — цитоплазматическая мРНК; г — белок-предшественник; д — активный белок.

1, 3, 7, 9 — некодирующие экзоны; 2, 5, 8 — интроны; 4, 6 — кодирующие экзоны; Е — энхансер; р — промотор; ► — иницирующий кодон; ◄ — терминирующий кодон; рА — терминатор транскрипции и сайт полиаденилирования; 7mG — 7-метилгуанозин; А_n — полиадениловая цепочка из n звеньев

Базовая часть промотора состоит из двух элементов (рис. 1.8, а). Один из них — инициатор — включает первый транскрибируемый нуклеотид (обычно это А, его координата +1) и предшествующий ему нуклеотид (обычно это С, его координата -1), а также окружающие их пиримидины (Py); общая формула инициатора — Py₂САРy₅. Другой элемент — ТАТА-бокс — расположен на отметке -25; его консенсус — ТАТАААА. РНК-полимераза II и набор транскрипционных факторов, работающих на базовой части промотора, образуют базовый транскрипционный аппарат клетки, который обеспечивает минимальный уровень транскрипции любого гена. Два из этих факторов взаимодействуют с элементами промотора. ТАТА-бокс распознается белком TBP (TATA-box binding

protein). Это способствует связыванию фактора TFIIB с инициатором и последующей посадке РНК-полимеразы II на комплекс, который образуется этими и другими базовыми транскрипционными факторами за счет белок-белкового взаимодействия друг с другом.

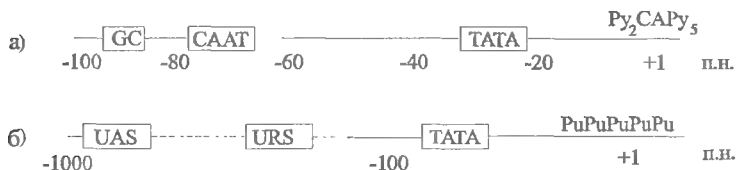


Рис. 1.8. Строение промоторов высших эукариот (а) и дрожжей (б)

Дополнительная часть промотора включает в себя два бокса, которые встречаются у большинства генов. Это СААТ-бокс (консенсус GGCCAATCT, координата -75) и GC-бокс (консенсус GGGCGG, координата -90). У многих генов в этой части промотора встречается октамер с консенсусом АТТТГСАТ и другие боксы, не имеющие четкой локализации. Отметим следующие особенности этих боксов: а) они могут встречаться в разном числе копий; б) они функциональны и в инвертированном положении (кроме СААТ-бокса); в) каждый из них может распознаваться различными транскрипционными факторами; г) некоторые из них являются сайтами регуляции активности генов (чаще всего — позитивной).

Итак, промоторы высших эукариот представляют собой мозаику из различных консервативных последовательностей. С ними взаимодействуют разные транскрипционные факторы, образующие сложные регуляторные агрегаты, в связи с чем Жакоб предложил называть их агрегулатами (Jacob, 1993). Отметим, однако, что никакой транскрипционный фактор и никакой бокс в промоторе (даже базовый) не являются строго обязательными для всех генов.

Аналогично организованы и дрожжевые промоторы (рис. 1.8, б), но их боксы (за исключением ТАТА-бокса) имеют другое молекулярное строение. Последовательности URS (upstream repressing sequence) и UAS (upstream activating sequence) встречаются только у регулируемых генов. Их роль ясна из их названия.

Регуляция. Особенностью транскрипционного аппарата эукариотических клеток является наличие в ДНК специфических локусов — энхансеров (enhancer — усилитель). Они участвуют в регуляции активности генов, увеличивая эффективность транскрипции ближайшего гена в десятки и сотни раз. При этом энхансер может находиться в любой ориентации по отношению к гену, располагаться с любой его стороны, внутри его (в интроне) и даже на расстоянии в несколько тысяч пар нуклеотидов. По многим своим свойствам, в частности по мозаичности строения, энхансеры напоминают дополнительные части промоторов, но только расположенные в стороне. Сходство усиливается и тем, что некоторые элементы (боксы) мозаики промоторов и энхансеров одинаковы, а также тем, что специфика регуляции экспрессии генов определяется элементами и/или промоторов, и/или энхансеров.

По способу регуляции экспрессии генов различают два типа энхансеров. Индуцибельные энхансеры реагируют на изменения в окружающей среде (тепловой шок, вирусная инфекция, появление тяжелых металлов, ростовых факторов, стероидов и т. п.). Такие энхансеры есть у генов белков теплового шока, металлотионина, β -интерферона, некоторых онкогенов и др. Канеспецифичные и временные энхансеры активны только в определенных клетках или в определенное время развития организма (например, энхансеры генов иммуноглобулинов). Механизм работы энхансеров заключается в посадке на них специфичных белков, которые за счет образования петель в ДНК взаимодействуют с транскрипционными факторами, связанными с промотором ближайшего гена, увеличивая тем самым число посадок на него РНК-полимеразы II. По-видимому, так же работают и локусы с противоположным эффектом действия — сайленсеры (silencer — успокоитель), в присутствии которых транскрипционная активность РНК-полимеразы II уменьшается. У дрожжей аналогами энхансеров и сайленсеров являются последовательности URS и UAS (см. рис. 1.8, б).

Таким образом, механизм регуляции транскрипции у эукариот более гибкий, чем у прокариот. Фиксированная химическая структура прокариотических промоторов более приспособлена для ре-

гуляции по принципу “все или ничего”, в то время как мозаичность строения эукариотических промоторов совместно со свойствами энхансеров позволяют осуществлять нюансированную регуляцию — от полной экспрессии до полной репрессии, что достигается путем локальной модификации ДНК, изменением внутриклеточных условий и т. д.

Формирование транскрипта. Транскрипция генов у эукариот происходит в ядрах, что приводит к образованию РНК-предшественников (пре-мРНК). Уже на начальном этапе синтеза к их 5'-концам через связь 5'—5' присоединяется необычное основание (сар) — 7-метилгуанозин. Этот процесс называется экппированием (capping). При рассмотрении механизма терминирования транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой II, следует различать два процесса — окончание синтеза транскриптов и образование 3'-конца мРНК. О первом процессе известно пока немного. Обрыв транскрипции каждого индивидуального гена детерминирован, но чем он определяется неясно. Возможно, какое-то значение имеет отмеченное во многих случаях обогащение конца генов тимидиновыми остатками. Во втором процессе ключевую роль играет гексамер AAUAAA, находящийся в транскрипте на расстоянии около 20 п.н. от сайта полиаденилирования. Гексамер распознается фактором специфичности, работающим в комплексе со специализированной эндонуклеазой и поли(А)-полимеразой, из которых первая отщепляет “хвост” транскрипта, а вторая присоединяет к 3'-концу зрелой мРНК около 200 адениловых остатков. Полиадениловая цепочка стабилизирует мРНК и способствует инициации трансляции, в связи с чем ее предложено рассматривать как трансляционный энхансер (Munroe, Jacobson, 1990).

Сплайсинг. Матричную роль РНК выполняют только в цитоплазме. Перед перемещением из ядра в цитоплазму предшественники мРНК укорачиваются и превращаются в мРНК. Размер типичного гена и ядерной РНК млекопитающих составляет 15—17 т.п.н., а размер мРНК — около 2 т.п.н. Разница в длинах ядерной и цитоплазматической мРНК является следствием сплайсинга — процесса удаления интронов из пре-мРНК и формирования непрерывной белок-кодирующей последовательности нуклео-

тидов. Сохранение правильной последовательности кодонов при сплайсинге достигается благодаря наличию на 5'- и 3'-концах интронов специфических последовательностей нуклеотидов. Эти последовательности высококонсервативны для белок-кодирующих ядерных генов любого происхождения, причем у всех интронов на 5'-концах находится динуклеотид GU, а на 3'-концах — динуклеотид AG (рис. 1.9).

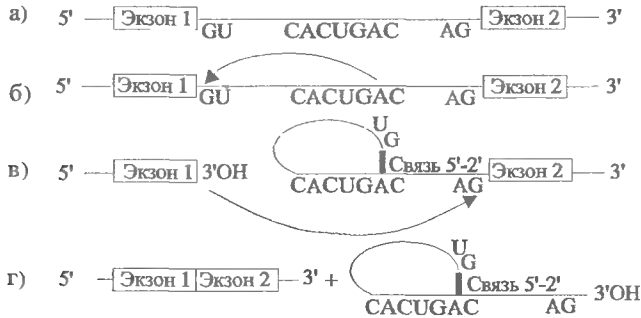


Рис. 1.9. Механизм сплайсинга ядерных генов животных:

- а — консервативные последовательности интрона;
- б — реакция трансэтерификации: с помощью сплайсосомы 2'ОН группа аденилового остатка сайта ветвления атакует 5'-фосфоэфирную связь интрона;
- в — образование лареата и вторая реакция трансэтерификации;
- г — объединение экзонов и освобождение лареата

Сплайсинг зависит и от видоспецифических последовательностей нуклеотидов — сайтов ветвления, располагающихся в интронах на расстоянии 20–40 п.н. от 3'-концов. В генах человека, мыши, крысы и других млекопитающих они представлены последовательностями CTGAC, дрозофилы — СТААТ, дрожжей — ТАСТААС. Эти последовательности обуславливают выбор динуклеотида AG на 3'-конце интрона. Если динуклеотид AG делетировать, то сплайсинг происходит по следующему такому же динуклеотиду. Сплайсинг осуществляется сплайсосомой, состоящей из нескольких малых ядерных РНК (snRNA), некоторые из которых и образуют каталитический центр, и неопределенного количества белковых факторов сплайсинга. Сплайсосома содействует сближению сайта ветвления с 5'-концом интрона и их ковалентному

соединению с образованием петли типа лассо, которая затем отсоединяется от экзона на 3'-конце, в результате чего экзоны смыкаются.

Отметим, что механизм сплайсинга в митохондриях и хлоропластах иной: здесь сама пре-мРНК обладает аутокаталитической активностью.

Сплайсинг — один из ярких примеров генной инженерии, осуществляемой природой. В некоторых генах, имеющих несколько интронов, возможен альтернативный сплайсинг, что приводит к синтезу белковых изоформ — различных пептидов, закодированных одним геном (см. обзор Andreadis *et al.*, 1987). Выбор способа сплайсинга определяется белковыми факторами, причем альтернативными могут быть 5'- или 3'-концы интрона. К примеру, ген кальцитонина крысы, содержащий два некодирующих и четыре кодирующих экзона, а также пять интронов (рис. 1.10), по-разному экспрессируется в различных тканях. В щитовидной железе он обеспечивает синтез гормона кальцитонина, регулирующего содержание в организме кальция, а в мозговых клетках обуславливает образование нейропептида CGRP (calcitonin gene related protein). Способность гена кальцитонина к дифференцированной экспрессии определяется альтернативным сплайсингом. Благодаря ему из пре-мРНК образуются два мРНК, имеющих общие 5'- и разные 3'-концы. Эти мРНК обеспечивают синтез двух пептидов, из которых в результате процессинга формируются активные гормоны — кальцитонин и нейропептид CGRP.

К редким случаям сплайсинга относится межмолекулярный, или транс-сплайсинг. Он обнаружен у некоторых видов трипаносом и нематод, а также у человека. Например, многие мРНК трипаносом имеют одинаковую 5'-лидерную последовательность, состоящую из 35 нуклеотидных остатков. Эта последовательность не кодируется индивидуальными генами, а присоединяется к их мРНК путем сплайсинга со специальным типом РНК, которые являются донорами 5'-экзонов (рис. 1.11).

Соединение белок-кодирующих сегментов из прерывных генов может происходить не только путем сплайсинга. Известны случаи, когда сборка кодирующей части гена осуществляется на

уровне ДНК. Это один из механизмов необратимой дифференцировки клеток. Так, например, формируются гены иммунной системы у позвоночных, в частности гены иммуноглобулинов. Задача обеспечения синтеза десятков миллионов разнообразных антител в природе решается путем образования генов легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов из комбинаций нескольких тысяч определенных генных сегментов. В этот процесс равный вклад вносят внутримолекулярные сайт-специфические рекомбинации между генными сегментами на уровне ДНК и сплайсинг.

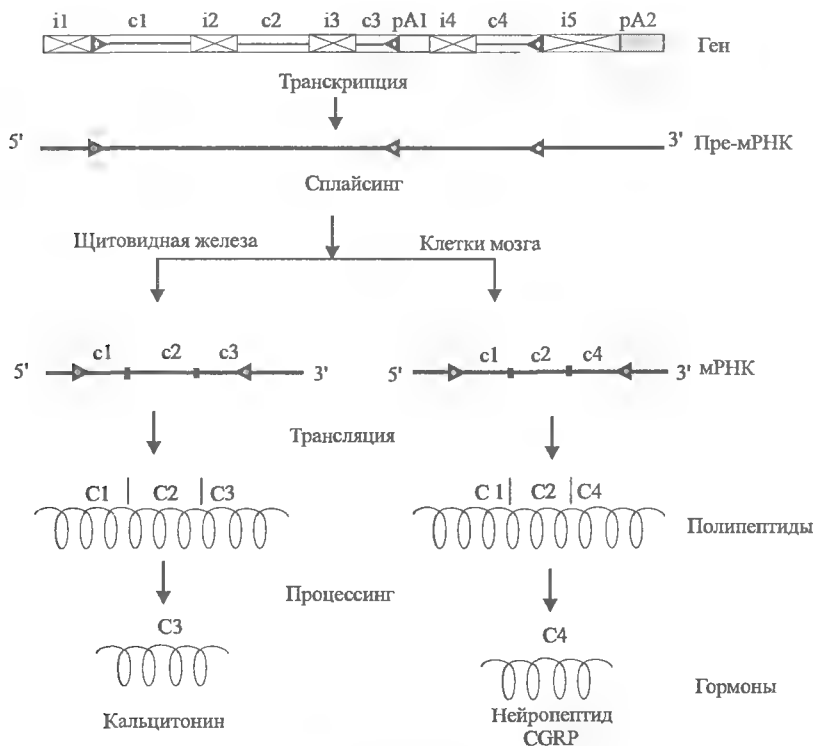


Рис. 1.10. Альтернативный сплайсинг при экспрессии гена кальцитонина крысы.

c — кодирующий экзон; i — интрон; ► — иницирующий кодон; ◄ — терминирующий кодон; pA — терминатор транскрипции и сайт полиаденилирования

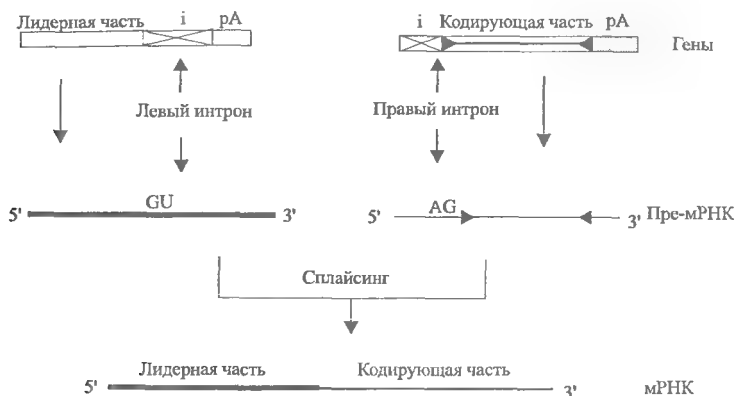


Рис. 1.11. Схема транскрипции (его механизм неизвестен).
 i — интрон; $\blacktriangleright$ — иницирующий кодон; $\blacktriangleleft$ — терминирующий кодон; pA — терминатор транскрипции и сайт полиаденилирования

Явление сплайсинга существует и у белков (см. обзор Belfort *et al.*, 1995). В процессе белкового сплайсинга из полипептидных цепочек удаляются нефункциональные олигопептидные вставки (интеины).

Трансляция. мРНК эукариот по своей природе моноцистронна, поэтому для посадки на нее рибосом и инициации трансляции выработался иной механизм, чем у прокариот. У типичной мРНК 5'-лидерная нетранслируемая часть занимает около 100 нуклеотидных остатков (н.о.). Далее следуют кодирующая и 3'-нетранслируемая части, размер последней — около 1000 н.о. Активную роль в инициации трансляции играет 7-метилгуанозин. Он распознается белком СВР (cap binding protein), способствующим связыванию нескольких факторов инициации трансляции eIF, которые в свою очередь способствуют посадке малой субъединицы рибосомы на мРНК и ее продвижению к стартовому кодону. Из нескольких AUG-кодонов, встречающихся на пути движения рибосомы, только тот является стартовым, который входит в состав сайта сборки рибосом: у высших эукариот — CC(A/G)CCAUGG, а у низших — (A/Py)A(A/U)AAUGUCU (Cigan, Donahue, 1987). Как правило, в подобные сайты входит первый AUG-кодон с 5'-конца мРНК. Здесь большая субъединица воссоединяется с малой и начинается сам акт трансляции (рис. 1.12).

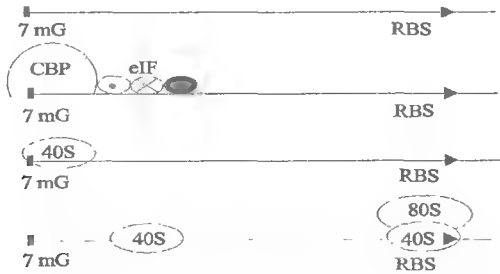


Рис. 1.12. Схема инициации трансляции эукариотической мРНК.

CBP — белок, связывающийся с 7-метилгуанозином (7mG); eIF — факторы инициации трансляции; ▶ — иницирующий кодон; RBS — сайт связывания рибосом; 40S и 60S — малая и большая субъединицы рибосом

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОВТОРЕНИЯ И ОБСУЖДЕНИЯ

1.1. Если пермеаза лактозного оперона, предназначенная для транспорта лактозы внутрь клетки, индуцируется только в присутствии лактозы, то как она появляется в клетке?

1.2. Почему промоторы оперонов катаболизма сахаров относительно слабы?

1.3. Какими преимуществами обладают гены (опероны), имеющие более одного промотора?

1.4. Возможна ли транскрипция обеих нитей ДНК в одном и том же локусе?

1.5. В чем разница способов узнавания промоторов РНК-полимеразы у про- и эукариот?

1.6. В чем сходство и различие механизмов формирования мРНК у про- и эукариот?

1.7. В чем разница способов узнавания инициаторных AUG-кодонов у про- и эукариот?

1.8. Возможен ли синтез полипептида, если исходно информация о нем содержится в разных транскриптах?

1.9. Назовите элементы негативной и позитивной регуляции лактозного оперона. Как действуют эти элементы при росте бактерий в среде, содержащей одновременно глюкозу и лактозу? Как при этом выглядит кривая роста бактерий? Как при этом изменяются концентрации глюкозы и лактозы?

1.10. Что такое энхансеры? Сделайте обобщение этого понятия, если известно, что его относят к процессам транскрипции и трансляции.

Глава 2

ТРАНСПОЗОНЫ

Фундаментальным свойством геномов является стабильность, что позволяет сохранять видовые особенности организмов из поколения в поколение (по вертикали во времени) в течение миллионов лет. Но на фоне этого происходит и горизонтальный перенос генов, который осуществляется подвижными генетическими элементами, плазмидами и вирусами. Он приводит к локальным изменениям в индивидуальных геномах, в этом смысле можно говорить и об определенной нестабильности генома.

Подвижные генетические элементы встречаются в ДНК всех организмов. Они представляют собой сегменты ДНК, способные к внутри- или межхромосомным перемещениям. У большинства из них центральная часть, содержащая информацию о механизме перемещения, фланкирована инвертированными повторами. Такая структура получила название транспозонной, а сами подвижные генетические элементы называют транспозонами.

Транспозоны обладают рядом специфических свойств. Они могут вызывать в ДНК полярные мутации, делеции и инверсии. Они способны также “включать” или “выключать” соседние с ними гены, поскольку в транспозонах есть промоторы и терминаторы транскрипции. Два родственных транспозона, находящиеся на одной хромосоме, могут переносить фрагмент ДНК, который заключен между ними, в другую область той же хромосомы или вообще в другую хромосому. Одинаковые транспозоны играют также роль подвижных областей гомологии, между которыми может происходить генетическая рекомбинация. Благодаря этим свойствам транспозоны играют важную роль в регуляции активности генов и перестройке геномов.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ТРАНСПОЗОНЫ

Транспозоны бактерий обладают сходной структурной организацией (рис. 2.1). Все они ограничены концевыми инвертированными повторами, протяженность и состав которых различны у разных транспозонов (от десятка до нескольких сотен п.н.). Однако у определенного транспозона они представляют собой своеобразные константы, т. е. не изменяются при его внедрении в разные сайты. Характерной чертой транспозонов бактерий является и тот факт, что с обоих концов они ограничены прямыми повторами реципиентной ДНК (ДНК-мишени). Протяженность этих повторов варьирует от 5 до 9 п.н., но для конкретного элемента она постоянна. Последовательность же нуклеотидов в повторах определяется местом локализации элемента. В сайтах независимого происхождения транспозон фланкирован повторами различного состава.

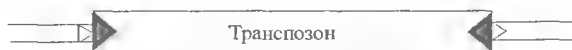


Рис. 2.1. Принципиальное строение бактериального транспозона.

- ▷ — прямые повторы ДНК-мишени;
- ▷ ◁ — концевые инвертированные повторы транспозона

Механизм транспозиции

Внутриклеточные перемещения транспозонов обусловлены специфическим механизмом транспозиции (рис. 2.2). Этот механизм обеспечивает встраивание транспозонов в реципиентную ДНК и образование в ней делеций, инверсий и дупликаций, а также исключение транспозонов из ДНК. Указанные операции осуществляются ферментами (транспозазами), которые кодируются генами транспозонов. Структурными компонентами транспозиции являются концевые инвертированные повторы транспозонов (хотя бы частичное их делетирование лишает транспозоны способности к транспозиции). Структура же повторов ДНК-мишени несущественна для транспозиции (замена одного из повторов на случайную нуклеотидную последовательность не влияет заметным образом на свойства транспозона).

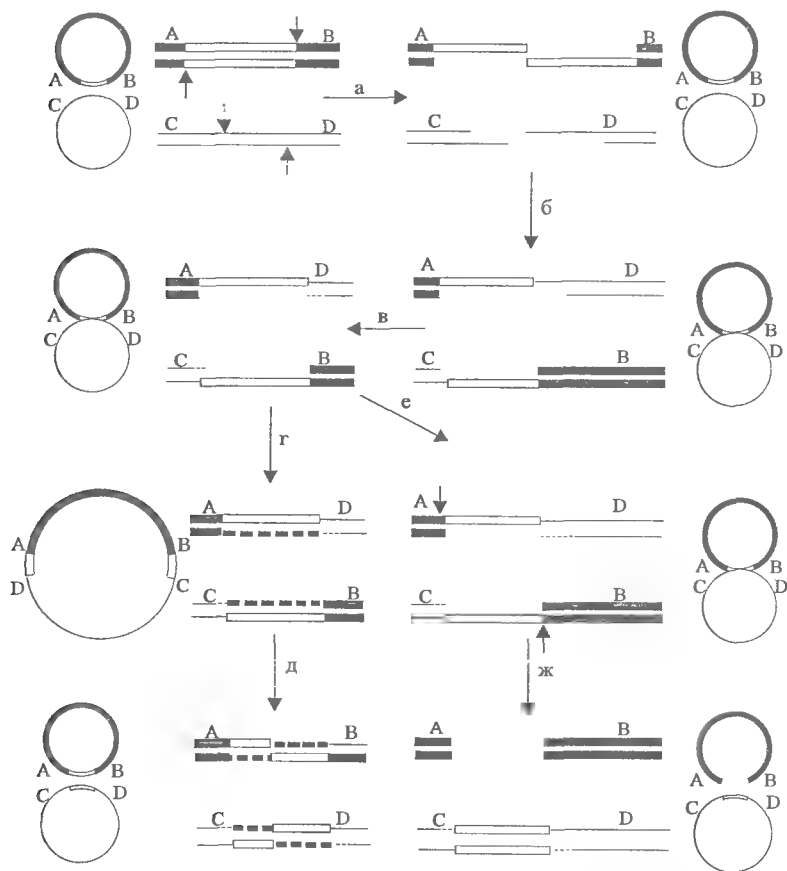


Рис. 2.2. Механизм транспозиции транспозонов.

Этапы *a—б—в—г—д* — репликативная транспозиция; этапы *a—б—в—е—ж* — нерепликативная (консервативная) транспозиция. События представлены схематично на уровне взаимодействующих кольцевых ДНК и более детально — на уровне двух нитей взаимодействующих сайтов. Жирными линиями выделена донорная ДНК, тонкими — реципиентная ДНК. Транспозон в донорном сайте отмечен полужирной линией. Штриховкой обозначены вновь синтезированный транспозон (жирные черточки) и повторы ДНК-мишени (тонкие черточки). Стрелки указывают на места действия транспозазы

Известно два разных механизма транспозиции — репликативный и нерепликативный. При репликативной транспозиции одна копия транспозона передается в реципиентную ДНК, а другая сохраняется в исходном (донорном) сайте. При нерепликативной транспозиции транспозон обнаруживается только в реципиентной ДНК.

Начальные этапы обоих механизмов и способ образования повторов ДНК-мишени в сайте внедрения транспозона одинаковы (Shapiro, 1979). Транспозаза делает одонитевые разрывы в донорной ДНК на обоих 3'-концах транспозона, образует одновременно в реципиентной ДНК ступенчатый разрез (см. рис. 2.2,а) и присоединяет ковалентно свободные 3'-концы транспозона к выступающим 5'-концам разреза (см. рис. 2.2,б). "Ступеньки" разреза ДНК-мишени, размер которых и определяет длину ее повтора, заполняются ДНК-полимеразой (см. рис. 2.2,в). Образовавшееся соединение (интермедиат) является общим для обоих механизмов транспозиции. При репликативной транспозиции одонитевые участки достраиваются с помощью ДНК-полимеразы до двунитевых. При этом интермедиат превращается в коинтеграт, в котором донорная и реципиентная ДНК разделены одинаково ориентированными транспозонами (см. рис. 2.2,г), окруженными повторами ДНК-мишени. Именно по области транспозонов происходит разъединение коинтеграта на две молекулы ДНК с помощью гомологической или сайт-специфической рекомбинации (см. рис. 2.2,д). Во втором случае процесс обеспечивается специальной рекомбиназой — резольвазой, кодируемой некоторыми транспозонами. При нерепликативной транспозиции транспозаза делает разрывы в других нитях донорной ДНК по обоим концам транспозона (см. рис. 2.2,е), а ДНК-полимераза и лигаза завершают перенос транспозона, присоединяя его освободившиеся одонитевые концы к другим концам разреза реципиентной ДНК (см. рис. 2.2,ж). Из-за двунитевого разрыва донорная ДНК при этом инактивируется.

Типы транспозонов

По степени сложности и с учетом особенностей строения различают три типа бактериальных транспозонов: IS-элементы (insertion sequences, табл. 2.1), Tn-элементы (собственно транспозоны, табл. 2.2) и Mu-подобные фаги.

Таблица 2.1

Характеристика наиболее изученных IS-элементов

Элемент	Длина, п.н.	Дупликация ДНК-мишени, п.н.	Концевой повтор, п.н.	Специфичность посадки
IS1	768	9	23	Случайная
IS2	1327	5	41	Горячие точки
IS3	1258	3	40	
IS4	1428	11—12	18	AAAN* ₂₀ TTT
IS5	1195	4	16	Горячие точки
IS10R	1329	9	22	GCTNAGC
IS30	1221	2	26	
IS50R	1534	9	9	GCN ₅ GC
IS101	209		35/38	
IS102	1000	9	18	
IS903	1057	9	18	Случайная

* Здесь и далее: N_n обозначает последовательность из n-произвольных нуклеотидных остатков.

Таблица 2.2

Характеристика наиболее изученных Tn-элементов

Транс- позон	Длина, т.п.н.	Устойчивость к антибиотикам*	Дополни- тельный маркер	Дуплика- ция ми- шени, п.н.	Концевой повтор, п.н.
Составные Tn-элементы					
Tn5	5,8	Km, Sm**, Bm		10	IS50L, IS50R, ин- вертированный
Tn9	2,638	Cm		9	IS1, прямой
Tn10	9,3	Tc		9	IS10L, IS10R, ин- вертированный
Tn903	3,1	Km, Nm		9	IS903, инверти- рованный
Tn1525	4,44	Km		8	IS15, прямой
Tn1681	2,062	—	Ent	9	IS1, инвертиро- ванный
Tn2350	10,4	Km		9	IS1, прямой
Tn2901	11,0	—	argF	9	IS1, инвертиро- ванный

Окончание табл. 2.2

Транс- позон	Длина, т.п.н.	Устойчивость к антибиотикам	Дополни- тельный маркер	Дуплика- ция ми- шени, п.н.	Концевой повтор, п.н.
<i>Tn3-подобные элементы</i>					
Tn3	4,957	Ap		5	38
Tn1, 2	5,0	Ap		5	38
Tn4	23,5	Ap, Sm, Su	Hg ^R	5	38
Tn21	19,6	Sm, Su	Hg ^R	5	35/38
Tn501	8,2	—	Hg ^R	5	35/38
Tn551	5,2	Em		5	35
Tn951	16,6	—	lacI, Z, Y	5	41
Tn1000	5,8	—		5	36/37
Tn1721	11,4	Tc		5	35/38
Tn5041	13,0		Hg ^R	5	47
<i>Tn7-семейство</i>					
Tn7	14,0	Sm, Sp, Tr		5	28
Tn402		Tr		5	25
Tn552					
Tn5053	8,447		Hg ^R	5	25
<i>Конъюгативные Tn-элементы</i>					
Tn916	16,4	Tc	tra	Нет	26
Tn918		Tc	tra		
Tn919	15—16	Tc	tra		
Tn1545	25,3	Tc, Em	tra	Нет	Нет
<i>Неклассифицированные элементы</i>					
**Tn6	4,1	Km, Nm			
Tn554	6,2	Em, Sp		Нет	Нет
Tn804	16,0	Tc		Около 200	
Tn1691	13,5	Cm, Gm, Sm, Su	Hg ^R	Около 100	
Tn1699	10,0	Ap, Cb, Gm, Km		Около 50	

* Расшифровка обозначений приведена в списке сокращений. Не проявляется в *E. coli*

IS-элементы. Простейшими и впервые описанными (Jordan *et al.*, 1968) транспозиционными модулями являются IS-элементы, состоящие из менее чем 2 т.п.н. Некоторые IS-элементы

были обнаружены как самостоятельные единицы (IS1—IS5), другие же, например IS10, IS50 и IS903, были найдены в составе транспозонов Tn10, Tn5 и Tn903, соответственно. Левый и правый инвертированные концевые повторы IS-элементов в большинстве случаев не идентичны друг другу. В центральной части IS-элементов находятся 1—2 открытые рамки считывания, кодирующие транспозазу. Таким образом, IS-элементы содержат только гены и сайты, способствующие их транспозиции, и поэтому не придают клеткам какой-либо легко распознаваемый фенотип. Конечно, IS-элементы, как и другие транспозоны, могут интегрироваться внутри генов, выполняющих определенные функции. Тогда об их присутствии можно судить по нарушению этих функций, а сам способ мутагенеза называют инсерционным. Факт внедрения (инсерции) указывают знаком двойного двоеточия. Например, *lacZ::IS4* обозначает разрыв гена β -галактозидазы элементом IS4.

IS-элементы являются естественными компонентами бактериальных хромосом и плазмид. В разных штаммах *E. coli* насчитывается от 4 до 19 копий IS1-элемента, от 0 до 12 копий IS2-элемента, около 10 копий IS3-элемента, 1—2 копии IS4-элемента и т. д. Их частоты транспозиции варьируют в пределах от 10^{-4} до 10^{-3} на элемент на генерацию, а частота внедрения в определенный ген составляет в среднем 10^{-6} на генерацию. “Излечение” от IS-элемента с восстановлением целостности гена не зависит от генов *recA* и транспозазы и происходит с частотой на три порядка меньшей.

Tn-элементы. Эти транспозоны более сложны по строению. В их составе свыше 2 т.п.н. Они придают клеткам устойчивость к различным антибиотикам и солям тяжелых металлов, содержат информацию о синтезе энтеротоксина, гемолизина, о сбраживании лактозы и в принципе могут нести любые другие гены. По особенностям строения среди них можно выделить группы составных транспозонов, транспозонов Tn3- и Tn7-семейств и конъюгативных транспозонов.

Составные транспозоны ограничены IS-элементами, находящимися в прямой (например, IS1 у транспозона Tn9) или инвертированной (например, IS10 у транспозона Tn10) ориентации (рис. 2.3). Именно в них содержится информация о транспозиции данных транспозонов. Концевые IS-элементы могут быть

идентичны друг другу (например, IS903) или отличаться несколькими нуклеотидами, что обычно вызывает дефектность одного из них. Так, у Tn5 и Tn10 только правые повторы (IS50R и IS10R) функциональны, а левые выполняют лишь структурную роль. Недефектные концевые IS-элементы способны к самостоятельному перемещению. IS10R (и, естественно, Tn10) не образуют стабильных коинтеграгов и переносятся нерепликативным механизмом. Вне зависимости от ориентации концевых IS-элементов составные транспозоны ограничены инвертированными повторами, поскольку концевые повторы самих элементов инвертированы. Центральная часть составных транспозонов несет гены, придающие клеткам устойчивость к антибиотикам и другие свойства.

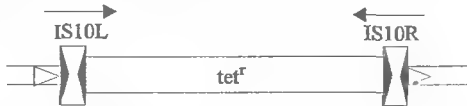


Рис. 2.3. Принципиальное строение составного транспозона Tn10.

- D — прямые повторы ДНК-мишени;
 A — концевые инвертированные повторы IS-элемента; тонкие стрелки — ориентация IS-элементов;
 tet^r — ген устойчивости к тетрациклину

Транспозоны Tn3-семейства встречаются в грамотрицательных и грамположительных бактериях, но, очевидно, имеют общее происхождение. Все они ограничены высоко гомологичными инвертированными концевыми повторами, состоящими из 35—48 п.н., и образуют повторы реципиентной ДНК из 5 п.н. Центральные области этих транспозонов, содержащие информацию об их транспозиции, в разной степени гомологичны друг другу. В большинстве из них локализованы также гены, придающие клеткам устойчивость к антибиотикам и (или) солям ртути. Только ген Hg^R содержит, например, транспозон Tn5041, найденный в клетках *Pseudomonas* (Kholodii *et al.*, 1997). Некоторые из транспозонов являются криптоическими, т. е. не сообщают клеткам дополнительный фенотипический признак. К ним, в частности, относится транспозон Tn1000, содержащийся в F-плазмиде. К Tn3-семейству

следует отнести и дефектный по транспозиции элемент IS101, присутствующий в плазмиде рSC101, так как для перемещения он использует транспозазы и резольвазы этого семейства.

Транспозон Tn3 — первый описанный Tn-элемент, кодирующий устойчивость к антибиотику (Hedges, Jacob, 1974). В его центральной части располагаются гены *bla* (*amp^r*), *tnpA* и *tnpR*, а также сайт *res* (рис. 2.4). Первый кодирует β-лактамазу и обеспечивает устойчивость клеток к ампициллину, второй отвечает за репликативную транспозицию, кодируя транспозазу, а третий содержит информацию о резольвазе. Через сайты *res* резольваза ведет сайт-специфическую рекомбинацию между транспозонами, “разрезая” образовавшийся в процессе транспозиции коинтегра́т. Наличие резольваз характерно только для транспозонов этого семейства.

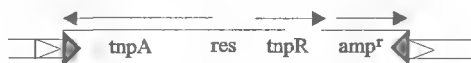


Рис. 2.4. Генетическая карта транспозона Tn3.

▷ — прямые повторы ДНК-мишени;

▷ ◁ — концевые инвертированные повторы

транспозона; стрелки над генами указывают направление их транскрипции

Транспозоны Tn3-семейства обладают транспозиционным иммунитетом. Это значит, что если в клетке имеется несколько репликонов, содержащих одинаковые транспозоны, то частоты межмолекулярных переносов снижаются на несколько порядков. В то же время внутримолекулярный перенос транспозона или перенос в свободный от транспозона репликон происходит нормально. У транспозона Tn3 транспозиционный иммунитет определяется одним из концевых повторов, причем в любой его ориентации и даже в изолированном состоянии. Транспозоны с почти идентичными концевыми повторами (Tn501, Tn1721 и др.) “иммунны” друг к другу.

Принадлежность транспозонов к Tn 7 - с е м е й с т в у пока определяется сходством функционального мотива их транспозаз. Кроме транспозонов, перечисленных в табл. 2.2, такой же мотив имеют транспозазы фага Mu и IS3-элементов, а также интегразы ретровирусов (Kulkosky *et al.*, 1992; Radstrom *et al.*, 1994), поэтому можно

говорить о Tn7-суперсемействе. Несмотря на сходство транспозаз, механизмы транспозиции его членов различны. Например, транспозоны Tn402 и Tn5053 следуют репликативному пути через образование и разрешение коинтеграгов (Kholodii *et al.*, 1995), а ретровирусы и транспозон Tn7 переносятся нерепликативным путем.

Описанные транспозиции касались перемещения подвижных генетических элементов внутри одной клетки. Однако у *Streptococcus faecalis* был найден транспозон Tn916, который с частотой около 10^{-8} передавался из клетки в клетку конъюгативным путем, оставляя в донорной клетке свою копию (Franke, Clewell, 1981). Затем были описаны и другие конъюгативные транспозоны, среди которых есть простые и композитные (см. обзор Scott, 1991). Длина конъюгативных транспозонов достигает 100 т.п.н., так как наряду с генами транспозиции они содержат *tra*-оперон, т. е. информацию о способе конъюгации (см. гл. 3). Все они обладают широким спектром хозяев и способны к транспозиции в грамположительных и грамотрицательных клетках. В этих же клетках они экспрессируют и имеющуюся в них детерминанту устойчивости к тетрациклину, и другие маркеры устойчивости к антибиотикам.

Механизм транспозиции транспозона Tn916 уникален, он похож на механизм выщепления и интеграции профага λ (см. гл. 4). Интегрированный транспозон находится под негативным контролем собственного репрессора. При случайной дерепрессии транспозон вырезается из донорного сайта в кольцевой форме и в зависимости от состояния *tra*-оперона либо внедряется в случайные участки клеточной или плазмидной ДНК внутри клетки, либо передается в реципиентные клетки. Его интеграция не сопровождается дубликацией ДНК-мишени. Как и профаг λ транспозон Tn916 подвержен зиготной индукции (см. гл. 4).

Фаг Mu. Умеренный фаг Mu (точнее, его ДНК) и Mu-подобные фаги являются наиболее сложными бактериальными транспозонами. Они найдены пока только в клетках *E. coli* и *Pseudomonas aeruginosa*, а дефектный вариант обнаружен у *Shigella dysenteriae*. Кроме генов, ответственных за интеграцию и транспозицию, в ДНК этих фагов имеются гены, определяющие их вегетативное развитие и созревание. Таким образом, как транспозоны они необычны тем, что имеют внеклеточную форму существования. В

этом они сходны с одним из типов эукариотических транспозонов — ретровирусами.

Из транспозонов данного класса лучше всего описан фаг Му (рис. 2.5). На концах его ДНК, состоящей из 37 т.п.н., расположены несовершенные повторы, которые распознаются транспозазой, кодируемой геном *A*. После инфекции клеток фагом Му этот фермент в процессе консервативной транспозиции сближает концы линейной фаговой ДНК и обеспечивает через них ее интеграцию в случайные участки бактериальной хромосомы, одновременно образуя повторы из 5 п.н. реципиентной ДНК. После этого возможны два пути развития фага — лизогенный или литический. Если ген-репрессор *c* подавляет транскрипцию гена транспозазы, то интегрировавшаяся Му ДНК “застревает” в виде профага в разных точках клеточной ДНК, поэтому в индивидуальных клонах локализация профага не изменяется. Репликативная транспозиция ДНК фага Му происходит при его литическом развитии. Перенос все увеличивающегося числа копий Му ДНК в разные участки бактериального генома постепенно приводит к его фрагментации, причем копии фаговой ДНК обнаруживаются в большинстве фрагментов. В этом процессе, кроме транспозазы, участвует продукт гена *B*.

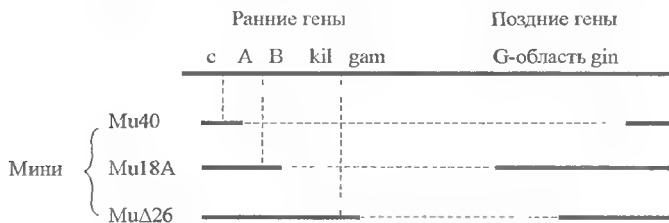


Рис. 2.5. Схема строения генома фага Му и некоторых мини-Му.

Штриховкой отмечена отсутствующая часть генома

Специфичность интеграции. Бактериальные транспозоны различаются по степени специфичности интеграции. Высокая степень свойственна элементам IS2, IS4, IS5 и IS50R. Например, консенсус сайта интеграции элемента IS5 представлен последовательностью CTAG. Транспозон Tn10 характеризуется средней степенью специфичности (консенсус GCTNAGC).

Транспозоны же Tn2, Tn4, Tn5 и ДНК фага Mu интегрируются вообще в случайных местах генома *E. coli*.

Частота транспозиции. У бактериальных транспозонов она также варьирует в широких пределах (от 10^{-7} до 10^{-4}). При прочих равных условиях она зависит от длины транспозона. Установлено, что частота транспозиции составных элементов, фланкированных прямо ориентированными IS1-элементами, уменьшается в два раза при каждом увеличении длины транспозона на 1 т.п.н.

Число копий. Этот параметр у транспозонов существенно зависит от генотипа клеток. Например, IS- и Tn-элементы распределяются в клетках различных видов бактерий далеко не равномерно. Так, на каждую клетку *E. coli* K-12 приходится от 4 до 19 копий IS1-элементов, на клетку *E. coli* C — по 3, *E. coli* B — по 14—19, *Sh. dysenteriae* и *Sh. flexneri* — более чем по 40 копий. В клетках же *S. typhimurium*, *Citrobacter freundii*, *Erwinia amylovora*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* их вообще нет.

ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ ТРАНСПОЗОНЫ

Во всех известных случаях эукариотические транспозоны выявлены во фракциях умеренно повторяющейся ДНК. Как правило, они составляют семейства элементов, обладающих сходными нуклеотидными последовательностями. Каждый из таких элементов представлен несколькими десятками копий, которые занимают различные положения в геномах клеток разных линий. Анализ природы подвижных генетических элементов эукариот позволил обобщить представления о способах их транспозиции. Стало ясным, что некоторые из них перемещаются в виде ДНК как бактериальные транспозоны, а другие — в виде РНК как ретровирусы. В соответствии с этим эукариотические транспозоны подразделяют на две больших группы — классические транспозоны и ретротранспозоны.

Классические транспозоны

Транспозоны этой группы, как и бактериальные, имеют на своих концах короткие инвертированные повторы, а при интеграции образуют около себя небольшие прямые повторы реципиентной ДНК.

Лучше всего охарактеризованы контролирующие элементы кукурузы, на существование которых указали опыты Б. Мак-Клинток еще в 50-х годах, и Р-элементы дрозофилы. В обоих случаях элементы обладают нерепликативным способом транспозиции.

Контролирующие элементы кукурузы. Свое название эти элементы получили благодаря тому влиянию, которое они оказывают на экспрессию соседних с ними генов. Они вызывают делеции, дупликации, инверсии и транслокации ближайших к ним участков ДНК, но все эти генетические перестройки входят в программу развития растения. В геноме кукурузы содержится несколько семейств контролирующих элементов, которые делятся на автономные и неавтономные элементы. Первые обладают собственными транспозазами и способны к самостоятельным перемещениям, а вторые перемещаются только в присутствии автономных элементов, относящихся к тому же семейству. Каждое семейство представлено одним определенным типом автономного элемента и десятком неавтономных элементов, имеющих разную длину. Например, автономный элемент *Ac* (activator) насчитывает 4563 п.н. и содержит только ген транспозазы, состоящий из пяти экзонов. Неавтономные элементы его семейства имеют длину от 4,5 до 2 т.п.н. Все элементы этого семейства обладают концевыми инвертированными повторами из 11 п.н. и окружены прямыми повторами реципиентной ДНК из 8 п.н. Таким образом, неавтономные элементы являются делеционными вариантами автономных элементов.

Р-элементы. Эти элементы были обнаружены благодаря их способности вызывать гибридный дисгенез у *Drosophila melanogaster* (Bingham *et al.*, 1982; Rubin *et al.*, 1982), что проявляется в асимметричных результатах скрещиваний мушек двух разных штаммов, Р и М. Скрещивание Р-самцов с М-самками обуславливает появление стерильного потомства, а скрещивание М-самцов с Р-самками дает плодовитое потомство. Как выяснилось, геном мушек штамма Р содержит до 50 копий Р-элементов, находящихся под контролем собственного репрессора, а в штамме М таких элементов нет. При слиянии Р-гапет с М-яйцеклетками Р-элементы дерепрессируются, и их транспозиция приводит к всевозможным перестройкам в ДНК зародышевых клеток. Размер Р-элемента —

2,9 т.п.н. Его инвертированные концевые повторы состоят из 31 п.н., а прямые повторы реципиентной ДНК из 8 п.н. Геном Р-элемента содержит четыре открытые рамки считывания (ORF), разделенные интронами. Единственный транскрипт генома подвергается тканеспецифическому сплайсингу: в транспозонной мРНК соматических клеток три первые ORF объединяются и кодируют белок-репрессор, а в зародышевой ткани мРНК содержит все четыре ORF и кодирует транспозазу (рис. 2.6). Члены Р-семейства образуются благодаря делециям, происходящим внутри Р-элемента, и способны перемещаться только в присутствии Р-элемента с помощью его транспозазы.

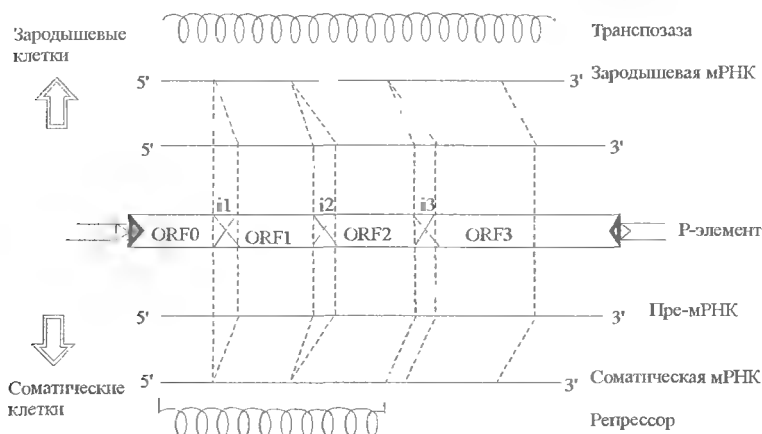


Рис. 2.6. Строение Р-элемента и его экспрессия в зародышевых и соматических клетках дрозофилы.

▷ — прямые повторы ДНК-мишени; ▶ ◀ — концевые инвертированные повторы Р-элемента; i — интрон; ORF — открытая рамка считывания

Транспозоны FB-семейства. Транспозоны этого семейства обнаружены у *D. melanogaster*. При общей длине 500—5000 п.н. они имеют инвертированные концевые повторы длиной 250—1250 п.н. Концы определенного транспозона неидентичны, но даже у разных транспозонов они обладают обширными областями гомологии. Центральные же части FB-транспозонов совершенно негомологичны друг другу. Они имеют разную длину, а иногда вообще отсутствуют (в таких случаях транспозон представляет собой типичную

палиндромную структуру). ФВ- транспозоны способны перемещать фрагменты ДНК длиной до нескольких сотен тысяч пар нуклеотидов, фланкируя их с обеих сторон. При перемещениях они образуют повторы реципиентной ДНК, содержащие по 9 п.н.

Ретротранспозоны

Ретротранспозоны представляют собой группу транспозонов, механизм перемещения которых во многом совпадает с жизненным циклом ретровирусов. Этот механизм включает в себя процесс копирования (транскрипции) транспозонов, обратное копирование образовавшейся РНК в дуплексы ДНК и внедрение последних в случайные участки клеточного генома. Обратное копирование происходит с помощью обратных транскриптаз, обнаруженных сначала у ретровирусов (Temin, Mizutani, 1970; Baltimore, 1970), а затем даже у *E. coli* (Lim, Maas, 1989). По этому признаку группа ретротранспозонов включает в себя сами ретровирусы, ретропозоны и ретрогены.

Ретровирусы. Они содержат одностороннюю РНК длиной 6—9 тысяч нуклеотидов, на концах которой расположены прямые повторы R и примыкающие к ним уникальные последовательности: U5 на 5'-конце и U3 на 3'-конце (рис. 2.7,а). Между ними находятся три локуса — *gag*, *pol* и *env*, кодирующие полибелки Gag, Gag—Pol и Env. В капсиде находятся две молекулы РНК, интегразы, обратная транскриптаза и клеточная тРНК (разная у разных вирусов). Молекулы тРНК служат праймерами в реакции обратной транскрипции для синтеза первой (–)-нити ДНК, связываясь для этого с вирусной РНК в сайте Р, расположенном в области U5-*gag*. Для праймирования синтеза (+)-нити ДНК важен полипуриновый тракт Р_и, находящийся в области *env*-U3. Сложная цепь полимеразных реакций завершается формированием линейной двунитевой ДНК (рис. 2.7,б), которая путем консервативной транспозиции с помощью интегразы внедряется в клеточную хромосому, образуя провирус. При этом, как и в случае фага Mu, генетические карты вирусной РНК и провируса оказываются одинаковыми (рис. 2.7,в). Всего в клеточном геноме появляется около десяти провирусов, через транскрипты которых и происходит размножение вирусов.

Провирусы ограничены длинными (250—1400 п.н.) концевыми повторами U3—R—U5, называемыми LTR (long terminal repeats), кото-

рые образуются в процессе обратной транскрипции за счет объединения и дупликации концевых участков вирусной РНК. На концах LTR, а следовательно, и провируса находятся короткие инвертированные повторы. Наличие прямых повторов ДНК-мишени (4–6 п.н.) дополнительно подчеркивает сходство провирусов с транспозонами.

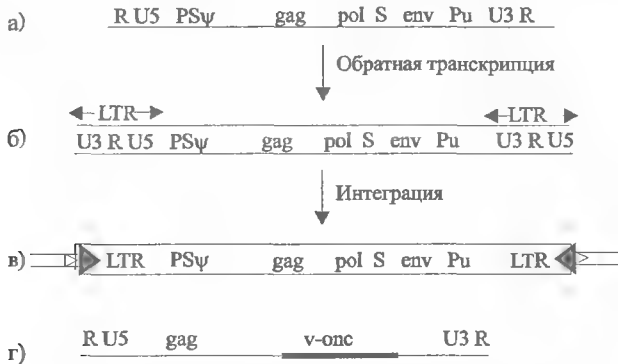


Рис. 2.7. Принципиальная схема строения генома ретровируса и его провируса: а — вирусная РНК; б — вирусная ДНК; в — провирус; г — РНК дефектного ретровируса, несущего онкоген (выделен жирной линией). ▷ — прямые повторы ДНК-мишени; ▶ ◀ — концевые инвертированные повторы провируса

LTR контролируют транскрипцию провирусной ДНК, так как в них находятся промотор (в U3), сайт полиаденилирования (в U5) и энхансер. Провирус транскрибируется в единую мРНК с промотора, находящегося в левом LTR, обеспечивая синтез полибелков Gag и Gag—Pol. Интересно заметить, что синтез полибелка Env происходит на субгеномной мРНК, которая образуется путем сплайсинга части вирусной РНК по сайтам S. Далее полибелки процессируются, превращаясь в десяток индивидуальных белков, в том числе структурных полипептидов и ферментов. В частности, интегразы, обратная транскриптаза и протеазы, которая ведет процессинг полибелков, кодируются областью *pol*. Транскрипты идентичны исходной вирусной РНК, поэтому они являются не только

матрицами для синтеза вирусных белков, но и могут упаковываться в вирусные капсиды, инициатором чего служит сайт *psi* (Ψ) расположенный рядом с U5.

Инфекция клеток ретровирусами хотя и не вызывает их гибель, но и не безразлична для них. Провирус инактивирует ген, в который он интегрировался, и может активировать соседний с ним клеточный ген с помощью своего энхансера или транскрипции с промотора, находящегося в правом LTR. Подобная незапрограммированная конститутивная экспрессия клеточного гена может привести к неконтролируемому делению клеток, если продукт гена каким-то образом влияет на их размножение. К такому же эффекту могут привести и мутации в некоторых генах. Подобные измененные гены называют клеточными онкогенами (*c-onc*), а их исходные аллели — протоонкогенами. Онкоген может оказаться и в составе вирусного генома. Вирусные онкогены (*v-onc*) имеют своих гомологов среди клеточных генов, но в отличие от них не содержат интроны. Очевидно, что они произошли от мРНК клеточных (прото)онкогенов, а онкогенные вирусы выступают в этом случае как природные векторы-переносчики генов. У разных вирусов гены *v-onc* внедряются в различные участки вирусного генома (рис. 2.7,г) и часто вызывают их дефектность. Такие вирусы могут размножаться только в присутствии родственных недефектных вирусов.

Ретропозоны. Они распадаются на два класса. Представители класса I по своему строению и механизму транспозиции схожи с ретровирусами, но не обладают их способностью к внеклеточному существованию.

Типичными ретропозонами класса I являются транспозоны дрожжей, обозначаемые буквами *Ty*. Первым открыт (Cameron *et al.*, 1979) и наиболее изучен *Ty1* (около 30 копий в гаплоидном геноме *Saccharomyces cerevisiae*). Его длина составляет 5,9 т.п.н., а на его концах находятся прямые δ -повторы размером 334 п.н. Синтез мРНК у транспозонов *Ty* начинается в левом и заканчивается в правом δ -повторе (рис. 2.8,а). Промотор и терминатор транскрипции расположены таким образом, что транскрипт обладает прямыми концевыми повторами из 45 п.н. В результате обратной транскрипции синтезируется дуплекс ДНК с δ -повторами, который и внедряется в случайный локус генома с частотой около 10^{-8} , обра-

зую повторы реципиентной ДНК длиной 5 п.н. Из двух открытых рамок считывания, *TyA* и *TyB*, которые аналогичны областям *gag* и *pol* ретровирусов, транспозицию транспозонов *Ty* осуществляют белки, кодируемые рамкой *TyB*. δ -Повторы встречаются в геноме дрожжей и вне транспозона, но они способны к транспозиции только в присутствии целого *Ty* транспозона.

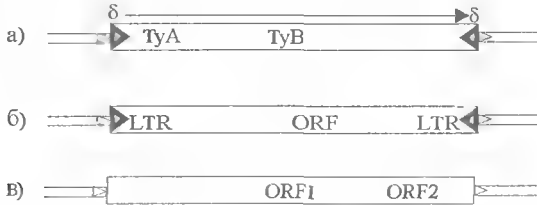


Рис. 2.8. Строение ретропозонов: *а* — *Ty* транспозон дрожжей; *б* — *copia*-элементы; *в* — *LINE*-элементы. ∇ — прямые повторы ДНК-мишени; $\blacktriangleright \blacktriangleleft$ — концевые повторы; стрелка над *Ty* транспозоном указывает направление его транскрипции

Около 20 семейств транспозонов дрозофилы объединяются под общим названием *copia*-подобные (рис. 2.8, *б*). Сюда входят, например, собственно *copia*-элементы, *mdg1*, *gypsy* и другие, каждое семейство представлено в геноме 5—100 копиями. По структуре и размеру *copia*-подобные транспозоны схожи с транспозонами *Ty*. Их длина в разных семействах варьирует от 5 до 9 т.п.н., а LTR — от 274 (*copia*) до 500 (*gypsy*) п.н.; повторы реципиентной ДНК состоят из 4—5 п.н. Расположение в геноме дрозофилы транспозонов, относящихся к разным семействам, различно, но для определенной линии мушек локализация членов одного семейства практически неизменна. Это свидетельствует об их крайне низкой частоте транспозиции, которая увеличивается до значений 10^{-4} — 10^{-3} на генерацию в клеточных культурах. При этом обнаруживаются полноразмерные транскрипты, служащие, очевидно, транспозиционными посредниками. Судя по наличию в *copia*-подобных транспозонах гомологии с *pol*-областями ретровирусов, их транспозиция осуществляется аналогичным образом.

Длина ретропозонов класса II — 5—7 т.п.н. У них отсутствуют LTR-повторы, а на 3'-конце одной из нитей располагается

типичный атрибут эукариотической мРНК: сайт полиаденилирования ААТАА и 12—30 адениловых остатков. Центральная часть этой же нити содержит открытые рамки считывания, полипептидные продукты которых в отдельных частях гомологичны консервативным участкам продуктов области *gag-pol* ретровирусов и ретропозонов класса I. Поэтому предполагается, что ретропозоны класса II кодируют собственную обратную транскриптазу и перемещаются посредством РНК, образуя повторы реципиентной ДНК. Однако из-за необычной структуры концов механизм транспозиции ретропозонов этого класса остается загадочным.

К ретропозонам класса II относятся F-, G-, I- и Jockey-элементы дрозофилы и семейство транспозонов LINES (long interspersed sequences; рис. 2.8, в), которые составляют значительную часть умеренно повторяющейся ДНК генома млекопитающих. Число последних достигает 50 тысяч в одном геноме, но лишь небольшая их доля имеет полную длину, 6—7 т.п.н. Полноразмерные элементы кодируют 1—2 белка, один из которых гомологичен обратной транскриптазе. Члены семейства, относящиеся к определенному виду, высоко гомологичны, в то же время разница в последовательностях нуклеотидов между разными видами весьма существенна.

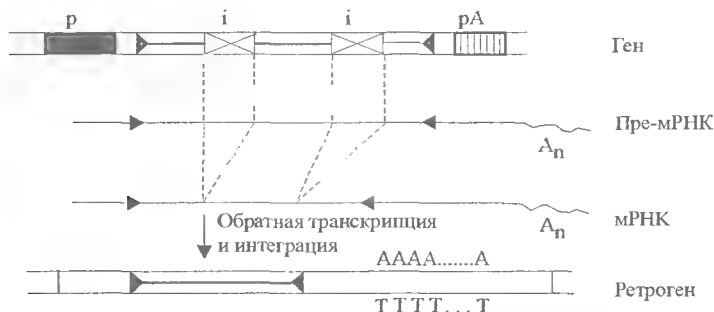


Рис. 2.9. Гипотетический механизм образования ретрогенов.

p — промотор; pA — терминатор транскрипции и сайт полиаденилирования; i — интрон; ► — иницирующий кодон; ◄ — терминирующий кодон; A_n — полиадениловая цепочка

Ретрогены. Ретрогенами названа большая группа элементов, которые, не обладая собственной обратной транскриптазой, по всем

признакам (наличие на 3'-конце одной из нитей А-богатого участка, повтора ДНК-мишени, присутствие членов семейства в различных геномных локусах) способны к ретротранспозиции. Их подвижность не доказана, но кажется очевидным, что, по крайней мере, образовались они при участии мРНК функционирующих генов с помощью обратной транскриптазы ретровирусов или ретропозонов (рис. 2.9).

Примером ретрогенов является семейство генов α -тубулина крысы, состоящее из одного функционального и трех безынтронных псевдогенов.

РОЛЬ ТРАНСПОЗОНОВ

Биологическая роль транспозонов определяется прежде всего их способностью индуцировать геномные перестройки и мутации, а также переносить гены.

Геномные перестройки. Два одинаковых транспозона, присутствующие в клеточной ДНК, могут вызвать в н у т р и х р о м о с о м н ы е перестройки. В зависимости от их направления относительно друг друга возможно образование делеций или инверсий участков ДНК, заключенных между ними. При этом один из концов этих перестроек фиксируется в любом концевом повторе, что свидетельствует об участии в этом процессе транспозазы. Как правило, сами элементы при этом сохраняются, и только у составных транспозонов, концевые повторы которых представлены IS-элементами, делеции и инверсии могут происходить и в центральной части. Протяженные инверсии выявлены, например, в ДНК клеток *E. coli* и *S. typhimurium* (см. гл. 5).

Велика роль IS-элементов и в м е ж х р о м о с о м н ы х взаимодействиях. Например, гомологическая рекомбинация между одноименными элементами, находящимися в F-плазмиде и бактериальной хромосоме, приводит к образованию Hfr-клеток и F'-плазмид (см. гл. 3). Hfr-клетки и F'-плазмиды могут образовываться и за счет транспозиционного механизма. Участки ДНК, заключенные между транспозонами, могут вести себя как самостоятельный транспозон. Перемещаясь внутри или между хромосомами, они в зависимости от механизма транспозиции вызывают транслокации или дубликации генов.

Мутации. Мутации, вызываемые интеграцией элементов, сильно полярны и ревертируют чрезвычайно редко, так как чаще всего копия транспозируемого элемента остается в исходном сайте. Интересно отметить, что интеграция транспозонов может привести и к противоположному эффекту — к экспрессии соседнего, “молчащего”, гена. Это свойство впервые было обнаружено у IS2-элемента, интегрированного в начало *gal*-оперона. В одном положении он инактивирует данный оперон, а в инвертированном может заменить дефектный промотор и способствовать экспрессии генов *gal*. Следовательно, многие транспозоны являются носителями “блуждающих” промоторов и в таком качестве, вероятно, неоднократно выступали при формировании оперонов в процессе эволюции (Kleckner, 1989). Исключение транспозона из хромосомы редко происходит с восстановлением прежней последовательности нуклеотидов. Если этот процесс сопровождается потерей или приобретением нуклеотидов без нарушения рамки считывания гена, то это ведет к появлению новой изо-формы белка, что может иметь селективные преимущества.

Перенос генов. Наиболее ярким проявлением природной функции бактериальных транспозонов является перенос ими генов, тем более что переносятся, главным образом, гены, определяющие устойчивость клеток к различным антиметаболитам. Правда, этот перенос, если не считать конъюгативных транспозонов, осуществляется только внутри клетки. Но именно благодаря ему данные гены включаются в плазмиды и вместе с ними распространяются в популяциях клеток разных видов, изменяя их способность к выживанию в неблагоприятных условиях. Конъюгативные транспозоны выполняют эту функцию самостоятельно. Например, первый найденный у энтеробактерий конъюгативный транспозон CTnscr 94 переносит локус *scr*, который придает клеткам способность использовать сахарозу как единственный источник углерода (Hochhut *et al.*, 1997).

Транспозоны могут интегрироваться друг в друга, образуя рекомбинантные мобильные элементы (комбинации Tn и IS) с разными наборами генов-маркеров (см., например, рис. 3.11). Что же касается способов приобретения самими транспозонами таких генов в процессе эволюции, то они были, по-видимому, многообразными. Один из них стал понятным после открытия и изучения интегронов.

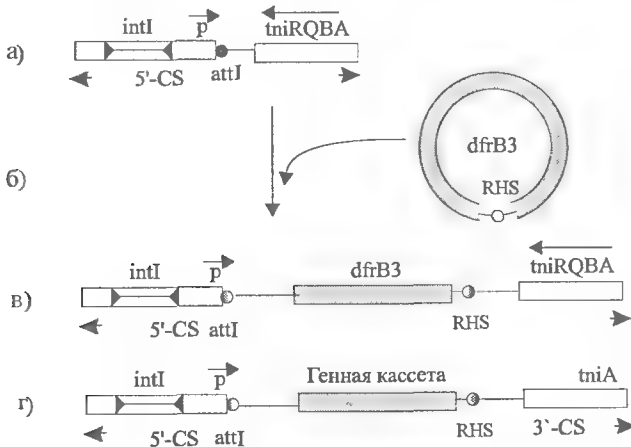


Рис. 2.10. Схема строения и функционирования интегров: *а, б, в* — гипотетическая схема образования транспозона-интегрона Tn402 путем “захвата” им гена *dfrB3*; *а* — интегрон без генной кассеты; *б* — генная кассета; *в* — Tn402; *з* — интегрон, неспособный к самостоятельному перемещению.

CS — консервативная последовательность; *p* — промотор; *intI* — ген интегразы; *dfrB3* — ген устойчивости к триметоприму; ► — иницирующий кодон; ◄ — терминирующий кодон; • — *attI*-сайт; о — сайт RHS; затемненный ду́плекс — беспромоторный ген; стрелки на концах интегрона — инвертированные повторы из 25 п.н.

Интегронами называют специфические генетические элементы, содержащие в своем составе интеграционный модуль — ген интегразы *intI*, правосторонний промотор и сайт интеграции *attI* (рис. 2.10). Благодаря модулю они способны захватывать, экспрессировать и перемещать генные кассеты. Последние представляют собой, как правило, беспромоторные гены устойчивости к антибиотикам, содержащие рекомбинационный сайт *RHS* (recombination hot spot). Такие гены обнаружены в плазмидах многих клинических изолятов грамотрицательных бактерий.

Первый интегрон был найден в транспозоне Tn21 (Stokes, Hall, 1989), затем они были идентифицированы в других транспозонах и плаزمидах. Анализ интегронов показал, что они являются дефектными производными транспозона Tn402, имеющего интеграционный модуль. Перенос этого транспозона обеспечивается опероном *tniABQR* и инвертированными концевыми повторами, состоящими из 25 п.н. Гипотетический механизм “приобретения” им гена устойчивости к триметоприму *dhfrB3* представлен на рис. 2.10, а, б, в. Выявленные к настоящему времени интегроны содержат постоянный 5'-сегмент (5'CS) с геном интегразы *intI*, правосторонним промотором и сайтом интеграции *attI* (рис. 2.10, г). 3'-сегмент (3'CS) содержит фрагменты *tni*-оперона разной длины, один или два IS-элемента, а завершается он инвертированным повтором из 25 п.н. Между ними заключен вариабельный сегмент с каким-либо беспромоторным геном устойчивости к антибиотику; такие гены экспрессируются только с помощью промотора 5'-сегмента. Из-за дефектности *tni*-оперона интегроны не могут перемещаться самостоятельно, но в присутствии транспозона Tn402 или родственного ему (по функции транспозиции) транспозона Tn5053 их перенос возможен (Kholodii *et al.*, 1995).

В 3'-конце вариабельного сегмента имеется сайт *RHS*. Интеграза интегронов способна с высокой вероятностью осуществлять сайт-специфическую рекомбинацию между сайтами *attI* и *RHS* или между двумя сайтами *RHS*. Благодаря этому вариабельные сегменты могут вычленяться в кольцевой форме и перемещаться в другие интегроны. Подобные генные кассеты могут интегрироваться с низкой вероятностью и во вторичные *attI*-сайты, встречающиеся в бактериальных и плазмидных геномах. В этом плане интеграза интегронов похожа на интегразу фага λ (см. гл. 4). Она способна также образовывать коинтеграаты из плазмид, содержащих интегроны, и объединять мобильные генные кассеты. Происхождение генных кассет неясно. Полагают, что они являются результатом обратной транскрипции определенных мРНК, что объясняет отсутствие у них промоторов (см. обзор Hall, Collis, 1995).

Интересно также отметить, что некоторые интроны генов оргanelл ведут себя как подвижные генетические элементы (см. обзор Lambowitz, Belfort, 1993). Такие интроны содержат открытую рам-

ку считывания. Белки, кодируемые интронами группы I, имеют гомологию с сайт-специфическими эндонуклеазами. Предполагается, что эти белки при участии рекомбиназ обеспечивают перенос копии интрона в безынтронный ген того же семейства. Интроны группы II содержат информацию о белках, обладающих значительным сходством с обратными транскриптазами. Возможно, они образуют ДНК-копии вырезанных интронов, которые затем внедряются в разные участки ДНК органелл.

Реакция на стресс. Следует отметить реакцию некоторых транспозонов на стрессовые для клетки ситуации, которая способствует их совместной выживаемости. Например, частота транспозиции транспозона Tn501 существенно увеличивается при наличии в среде ртути, а транспозона Tn551 — в присутствии эритромицина. Отмечено увеличение частоты транспозиции ретротранспозона Ty при обработке дрожжевых клеток определенными мутагенами.

О роли транспозонов в эволюции геномов уже упоминалось. Согласно Хесину (1984), транспозоны являются агентами, осуществляющими связь между геномами всех организмов. Поэтому, по его предположению, генофонды всех организмов объединены в общий генофонд всего живого мира.

ПРИМЕНЕНИЕ ТРАНСПОЗОНОВ

Транспозоны, в том числе и фаг Mu, нашли широкое применение в молекулярной генетике. Прежде всего следует отметить, что они могут служить мутагенами. Чаще для этого используют транспозон Tn5. Причин для этого несколько. 1. Он слабо специфичен к сайтам интеграции, и поэтому легко переносится в хромосому, а также во внехромосомные элементы. 2. При его транспозиции низка вероятность геномных перестроек. 3. Он стабильно поддерживается в интегрированном состоянии. 4. Он способен к транспозиции во многих видах грамотрицательных клеток. Транспозоны Tn1 и Tn3 перемещаются главным образом в плазмиды. Перенос их в небольшие плазмиды происходит без дополнительных эффектов, в то время как интеграция в крупные плазмиды часто сопровождается делециями соседних областей плазмидной ДНК. Следует отметить, что для мутагенеза используют не сами транспозоны, а их варианты, полученные *in vitro* и

содержащие разнообразные селективные маркеры. Из таких вариантов наименьшим по размеру является Tn5^{sup}F (264 п.н.), предназначенный для мутирования и секвенирования генов, клонированных с помощью фага λ (см. гл. 9).

Чтобы вызвать мутации в фагах, их пассируют в клетках, содержащих транспозон-мутagen. Мутантные фаги находят в полученном фаголизате, инфицируя фагами подходящие тестерные штаммы. Например, при использовании транспозона Tn5^{sup}F инсерционные мутанты фага λ легко выделяются по их росту в клетках *E. coli sup*^o, если исходный фаг содержал амбер-мутации (Phadnis *et al.*, 1989). Плазмиды, предназначенные для мутирования, вводят в транспозон-содержащие клетки, а затем переносят в другие клетки и находят бактерии с фенотипом, который определяется мутирующим транспозоном. Перенос плазмидной ДНК осуществляют с помощью трансформации или методом конъюгации (в случае конъюгативных плазмид, см. гл. 3). Если транспозон-мутagen исходно находится в плазмиде, то плаزمид-донор должна иметь условнолетальный дефект по репликации либо быть просто неспособной реплицироваться в данном виде клеток. Это необходимо, чтобы в процессе поиска мутантных плазмид в селективных условиях сохранились лишь клетки с теми реципиентными плазмидами, в которые интегрировался транспозон. Сайты внедрения транспозонов можно картировать с помощью электронной микроскопии гетеродуплексных молекул ДНК, но существенно проще это делать методом рестрикционного анализа (см. гл. 8).

Транспозоны используют и с целью создания в нужных местах ДНК областей гомологии для RecA-зависимой рекомбинации, а также для внесения подходящих сайтов рестрикции (см. гл. 6) с целью дальнейших генетических манипуляций *in vitro*.

Свойство ДНК фага Mu образовывать коинтеграаты используют для переноса генов и конструирования *in vivo* рекомбинантных плазмид. С помощью этого фага осуществляют, например, интеграцию кольцевых генетических элементов (фаговые или плазмидные ДНК) в бактериальную хромосому по механизму, представленному на рис. 2.2. В таких случаях интегрированный элемент оказывается фланкированным двумя профагами Mu.

Для переноса генов особенно удобны мини-Mu фаги (Resibois *et al.*, 1981). Так называют фаги Mu, у которых после

операций *in vivo* (или *in vitro*) утрачиваются литические функции (см. рис. 2.5), но сохраняются, по крайней мере, концы ДНК и ген *A* (например, Mu18A). Без фага-помощника мини-Mu фаги могут интегрироваться в бактериальную хромосому, образовывать делеции и вызывать слияние репликонов. Если же у мини-Mu фага сохраняются и другие ранние функции, как, например, у MuΔ26, он, кроме того, способен осуществлять перенос бактериальных фрагментов. Мини-Mu фаг Mu40, утративший все существенные гены, переносит гены только в присутствии фага-помощника.

Круг возможностей мини-Mu фагов существенно расширился после введения в них различных репликаторов, маркеров антибиотикоустойчивости и генов-репортеров (Groisman, Casadaban, 1986). Это позволило не только извлекать гены из хромосомы и переносить их, но также проводить их анализ и мультипликацию (клонирование).

Мини-Mu фаги отличаются целым рядом преимуществ перед другими транспозонами в плане осуществления геномных перестроек и клонирования ДНК *in vivo*: 1) у них высока частота транспозиции; 2) нет специфичности к сайтам интеграции; 3) достаточно широк круг хозяев; 4) ими можно управлять с помощью термочувствительного репрессора (продукт гена *c*); 5) мини-Mu ДНК упаковывается *in vivo* в фаговые головки, поэтому ее можно переносить в другие клетки путем их инфекции.

Фаги Mu и мини-Mu могут трансдуцировать бактериальные гены благодаря тому, что на концах их ДНК (в основном на правом конце, где локализуется ген *S*) имеются вариабельные по длине и нуклеотидным последовательностям участки бактериальной ДНК. На *S*-концах эти участки достигают 1—2 т.п.н. Их размер определяется разностью между емкостью фаговой головки (38 т.п.н.) и длиной Mu ДНК (37 т.п.н.). Здесь может располагаться целый бактериальный ген, который фаг Mu способен переносить и который с частотой 10^{-9} — 10^{-7} может встроиться в бактериальную хромосому за счет RecA-зависимой рекомбинации. Фаг мини-Mu осуществляет ту же трансдукцию с частотой на два порядка выше, так как из-за небольшого размера его ДНК (несколько тысяч пар нуклеотидов) длина участка бактериальной ДНК на *S*-концах может достигать 30 т.п.н.

При репликации ДНК мини-Му фагов некоторые фрагменты бактериальной ДНК размером до 25—30 т.п.н. могут оказаться между двумя мини-Му ДНК, находящимися в одной ориентации. Такие структуры ведут себя как транспозоны. После упаковки в фаговые головки и последующей инъекции в клетки они способны интегрироваться в случайные места клеточной хромосомы. Этот способ *RecA*-независимой трансдукции получил название мини-мюдукции. Мини-мюдукцию используют, например, для переноса и интеграции методами *in vivo* чужеродных генов, когда *RecA*-зависимая рекомбинация неприменима. Частота мини-мюдукции низка (около 10^{-9}), поэтому используют мини-Му фаги с селективным маркером. Например, в мини-Му фаг Mu184 был введен ген *bla*, позволяющий отбирать мини-мюдуктанты по их устойчивости к ампициллину.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОВТОРЕНИЯ И ОБСУЖДЕНИЯ

2.1. Почему при репликации Му ДНК происходит фрагментация бактериального генома?

2.2. Генетические карты фага и профага Му одинаковы. Почему?

2.3. Слева или справа от любого конъюгативного транспозона находится участок ДНК длиной несколько пар нуклеотидов, который он “прихватил” с собой из предыдущего сайта интеграции. Предложите модель транспозиции конъюгативных транспозонов.

2.4. Между двумя одинаковыми транспозонами может происходить гомологическая рекомбинация. К какому эффекту это приводит при локализации этих транспозонов: а) на одной хромосоме? б) на разных хромосомах?

2.5. В области расположения транспозона могут возникать делеции или инверсии. Чем это может быть вызвано?

2.6. Перечислите типы геномных перестроек, вызываемых бактериальными транспозонами.

2.7. Составьте план эксперимента по мутированию плазмидной ДНК, если транспозон-мутagen находится в составе: а) бактериальной хромосомы; б) другой плазмиды.

2.8. Почему мини-мюдукция является *RecA*-независимой?

2.9. “Излечение” от транспозонов с восстановлением целостности гена не зависит от генов *recA* и транспозазы. Предложите модели этого механизма.

2.10. Предложите возможный механизм образования дефектного ретровируса (см. рис. 2.7,з), несущего онкоген.

Глава 3

ПЛАЗМИДЫ

Плазмиды определяют как стабильно наследуемые внехромосомные генетические элементы. Они являются обычным компонентом бактериальных клеток, но встречаются также и у низших эукариот. В большинстве случаев плазмиды представляют собой суперскрученные ковалентно-замкнутые кольцевые молекулы ДНК длиной от 2 до 600 т.п.н. Благодаря кольцевой структуре они не подвергаются действию экзонуклеаз. Существуют также линейные плазмиды, устойчивость которых к действию экзонуклеаз обеспечивается тем, что концы нитей их ДНК защищены белками (Hirochika, Sakaguchi, 1982) или соединяются ковалентно (Сварчевский, Рыбчин, 1984; рис. 3.1).

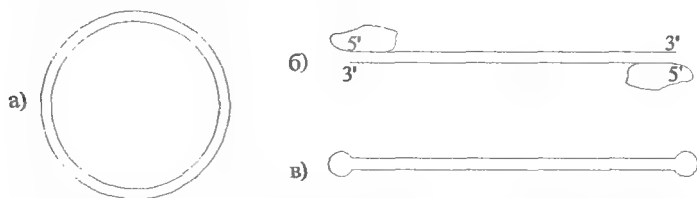


Рис. 3.1. Типы плазмид: а — кольцевая; б — линейная с белком на 5'-конце; в — линейная с концевыми шпильками, замыкающими ковалентно обе нити ДНК

Клетки, приобретающие плазмиды, как правило, приобретают и новые признаки. Эти признаки легли в основу названий обнаруженных впервые плазмид, а именно: F-плазмид (фактор пола), придающих клеткам донорные свойства; Col-плазмид, способствующих синтезу колицинов; и R-плазмид, определяющих устойчивость (резистентность) клеток к антибиотикам. Многие свойства плазмид зависят от содержащихся в их составе транспозонов.

Общие свойства бактериальных плазмид

Репликация. Основным свойством плазмид является способность к автономной репликации. Молекулы ДНК приобретают ее в том случае, если в них имеется сайт начала репликации — *ori* и, как правило, набор генов, необходимых для ее осуществления. Такие молекулы получили название репликонов. Хромосомы прокариотических клеток содержат по одному *ori*-сайту, поэтому они относятся к монорепликонным системам. Плазмидные ДНК могут иметь по несколько *ori*-сайтов. Репликоны функционируют лишь тогда, когда в клетках есть все необходимые для этого ферменты. Клеточные хромосомы включают полный набор генов, кодирующих белки репликационного комплекса. Внехромосомные же генетические элементы содержат не все необходимые для этого гены, поэтому в их репликации принимают участие и клеточные ферменты. В большинстве случаев кольцевые плазмиды грамотрицательных бактерий реплицируются односторонне в тета-форме (закрытое кольцо; рис. 3.2), а грамположительных — в сигма-форме (катящееся кольцо; см. с. 94).

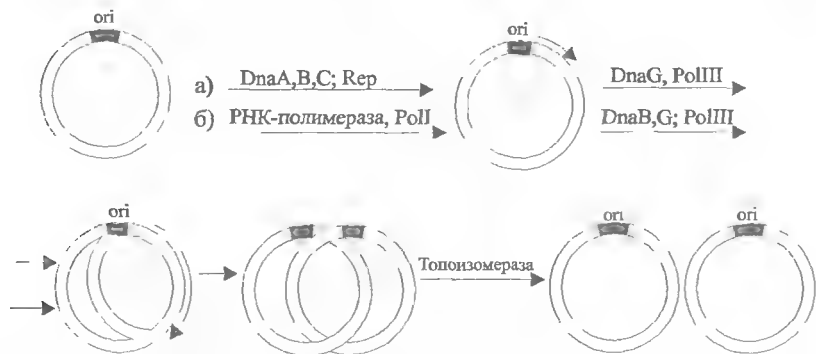


Рис. 3.2. Схема односторонней репликации кольцевых плазмид в тета-форме: а — строгий контроль; б — ослабленный контроль

Различают плазмиды со строгим и ослабленным контролем репликации. Минимальный размер плазмид со строгим контролем репликации 20—30 т.п.н., а максимальный — на порядок больше. Плазмиды с ослабленным контролем репликации обычно невелики по размеру — не более 15—30 т.п.н.

Строгость контроля репликации плазмид заключается в наличии у них механизма ограничения числа копий до 1—3 молекул на клетку. При этом репликация кольцевых плазмид осуществляется, как правило, клеточными репликативными комплексами (реплиосомами). В клетках *E. coli* хромосомный *ori*-сайт (*oriC*) содержит четыре 9-членных *dnaA*-боксы (консенсус ТТАТ(С/А)СА(С/А)), с которыми связывается белок DnaA. Он “плавит” структуру ДНК в *ori*-сайте и при содействии белка DnaC способствует посадке на этот сайт геликазы DnaB. Образовавшийся комплекс распознается праймазой DnaG и ДНК-полимеразой III, состоящей из кор-фермента DnaE и других субъединиц (Kornberg, Baker, 1992), что иницирует движение репликационных вилок в обоих направлениях. Плазмиды *E. coli* со строгим контролем репликации используют все вышеперечисленные белки, включая инициаторный белок DnaA, для которого в их *ori*-сайтах имеются *dnaA*-боксы. Но основную роль в инициации репликации играют собственные инициаторные белки (Rep-белки), узнающие в плазмидных *ori*-сайтах специфические множественные прямые повторы (итероны).

Плазмиды *E. coli* с ослабленным контролем репликации для инициации репликации используют РНК-полимеразу и ДНК-полимеразу I. Элонгацию ведет ДНК-полимераза III. В каждой бактериальной клетке содержится в среднем 40—50 плазмидных копий, такие плазмиды называют еще мультикопийными. Разница между строгим и ослабленным контролем репликации плазмид особенно заметна, когда клетки переходят из экспоненциальной фазы роста в стационарную. При этом плазмиды со строгим контролем и бактериальная хромосома перестают реплицироваться, в то время как плазмиды с ослабленным контролем продолжают дупликацию, и их масса в клетке может достигать массы бактериальной ДНК. Аналогичная картина наблюдается и в условиях остановки синтеза белков, например при добавлении в среду хлорамфеникола. Каждый раунд репликации бактериальной ДНК и плазмид со строгим контролем требует синтеза иницирующих белков, поэтому синтез этих ДНК останавливается. Плазмиды же с ослабленным контролем в таких условиях способны иницировать новые раунды репликации, поэтому их число может достигать нескольких тысяч на клетку.

Репликация плазмид обоих классов осуществляется в основном бактериальными белками. Поскольку эти белки в клетках разных видов бактерий отличаются друг от друга, то плазмиды поддерживаются только в ограниченном числе близкородственных видов клеток. Известны, однако, примеры плазмид, имеющих широкий круг клеток-хозяев. Такие плазмиды обладают гибкой системой белков, необходимых для их поддержания в различных семействах бактерий.

Интеграция. Плазмиды со строгим контролем репликации способны к интеграции в бактериальную хромосому через IS- или Tn-элементы, содержащиеся в их геноме. При этом они подчиняются репликационному аппарату бактериальной хромосомы и могут неопределенно долго существовать в ее составе. Такие плазмиды с двойным “образом жизни” получили название эписом (например, плазида F).

Конъюгация. Свойством многих плазмид является их способность передавать свою копию в другие клетки методом конъюгации. Плазмиды, обладающие этим свойством, называют конъюгативными, или трансмиссибельными; они содержат в своем геноме оперон *tra*. Этот оперон обеспечивает образование конъюгационного мостика между клетками, по которому может переноситься одна из нитей плазмидной или бактериальной ДНК. Он вызывает также появление у клеток пилей (волосков) определенного типа, способных адсорбировать специфические фаги.

Конъюгативные плазмиды свойственны, главным образом, грамотрицательным бактериям. Они, как правило, имеют довольно ограниченное число клеток-хозяев, в которые могут переносить и реплицировать свою ДНК. Но среди них есть плазмиды и с широким кругом клеток-хозяев. Например, плазида RP4, выделенная из бактерий *Pseudomonas*, переносится и стабильно поддерживается в грамотрицательных клетках *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* и др. Следует подчеркнуть, что такой канал переноса генов между различными видами и родами бактерий способствует адаптации клеток к изменяющимся условиям.

Мобилизация. Многие неконъюгативные плазмиды обладают свойством мобилизации, т. е. способностью переноситься в другие

клетки с помощью конъюгативной плазмиды. У таких плазмид имеется специальный локус, обеспечивающий передачу их ДНК через “чужой” конъюгативный мостик (мобилизация *in trans*). Возможен и другой путь. Наличие транспозонов в плазмидах способствует их объединению друг с другом, т. е. образованию коинтегратов. Неконъюгативная плазида может быть перенесена в другую клетку в составе коинтеграта с конъюгативной плазмидой (мобилизация *in cis*). Коинтеграты в реципиентных клетках распадаются на исходные репликоны, которые продолжают автономное существование.

Несовместимость. Если плазмиды не могут стабильно сосуществовать в одной клетке в условиях отсутствия селективного давления, их называют несовместимыми. Несовместимость плазмид обуславливается подавлением репликации одной из них и (или) блокированием распределения дочерних молекул ДНК по клеткам перед их делением. Эти оба механизма действуют независимо друг от друга.

Несовместимость, вызванная подавлением репликации, наблюдается у плазмид как со строгим, так и с ослабленным контролем репликации. Она обусловлена существованием у плазмид генетического механизма поддержания числа плазмидных копий на определенном уровне, который приводит к тому, что в клетке только одна из двух плазмид (резидентная или с меньшей вероятностью вошедшая) сохраняет способность к удвоению.

Несовместимость, вызванная блокированием распределения дочерних молекул ДНК по клеткам, характерна для низкокопийных плазмид. В ее основе лежит факт конкуренции плазмид за сайты на цитоплазматической мембране, обеспечивающие их распределение при делении клеток.

Тест на совместимость позволяет разделять плазмиды на группы несовместимости (табл. 3.1). У *E. coli* их насчитывается более 30. Плазмиды, входящие в одну группу, несовместимы, т. е. исключают друг друга. Несовместимыми могут быть и плазмиды с разным фенотипическим проявлением. Например, в группу F1 входят плазмиды типа F (половой фактор), Col (колициногенность) и R (устойчивость к антибиотикам).

Поверхностное исключение. На практике определение групп несовместимости осложняется явлением поверхностного исключения (surface exclusion), свойственным конъюгативным плазмидам.

Дело в том, что если в реципиентной клетке уже имеется конъюгативная плаزمид, то при конъюгации с ней другая плазмидная ДНК проходит через клеточную оболочку с трудом. Частота переноса плазмид при этом падает в 10—100 раз по сравнению с таковой в бесплазмидные клетки. Плазмиды, преодолевшие этот барьер, стабильно сосуществуют с плазмидой-резидентом, если они, конечно, совместимы.

Таблица 3.1

**Конъюгативные плазмиды *E. coli*,
используемые в тестах на несовместимость**

Группа не-совместимости	Плаزمид	Группа не-совместимости	Плазмид
A	pIP55	K	R387
B	R16	N	N3, R15, R46
D	R711b	OF	pIE509
FI	F, ColV, R386	P	RP4
FII	R1, R6, R100	T	Rts1
FIII	ColB-K98	U	R1460
FIV	R124	W	S-a, R7K, R338
HI	R27	X	R6K
HI1	pHH1508a	Y	IP231a
II	R64, R144, Collb-P9	Z	pIE545
II	TP114, R483, R621a	9	pIP71a
J	R391		

Стабильность. Как и всего живого, главное в “жизни” плазмид — это обеспечение своего стабильного существования. Для этого в процессе эволюции у них выработалось несколько механизмов: надежный контроль числа копий, точное распределение плазмидных ДНК по дочерним клеткам, разрешение коинтеграгов и постсегрегационная гибель бесплазмидных клеток (см. обзор Nordstrom, Austin, 1989).

Контроль числа копий осуществляет базовый репликон плазмиды (его размер около 2—3 т.п.н.), в который входят сайт начала репликации *ori*, сайты контроля за копийностью *cop* и несовместимостью *inc* (incompatibility), а также гены, чьи продукты функционируют на этих сайтах. По механизму контроля процесса

репликации базовые репликоны делятся на два типа. В одних репликонах контроль осуществляется с помощью асРНК либо на уровне праймера репликации в *ori*-сайте (например, плаزمида с ослабленным контролем репликации ColE1), либо на уровне транскрипта репликационного гена (например, плазмида со строгим контролем репликации R1). В репликонах другого типа контролирующий белок выполняет свою функцию, взаимодействуя с итеронами, присутствующими в сайтах *cor* и *inc* (например, плазмиды со строгим контролем репликации F и P1). В обоих случаях контролирующий механизм поддерживает заданное число копий плазмиды в клетке. Если, например, в клетке оказались две родственные малокопийные плазмиды, то механизм контроля замечает наличие двух гомологичных *ori*-сайтов и разрешает только завершение уже начатого раунда репликации, блокируя инициацию нового. В этом и состоит причина несовместимости таких плазмид.

Термочувствительные мутации в сайте *cor* позволяют в условиях эксперимента регулировать число копий плазмид, имеющих строгий или ослабленный контроль процесса репликации. В ряде случаев полезны мутации (их называют *run-away*), приводящие при 42 °С к синтезу более 2000 копий плазмид на клетку и вызывающие гибель клеток (см. гл. 10).

Механизм распределения плазмидных ДНК по дочерним клеткам, как уже отмечалось, является еще одной причиной несовместимости у малокопийных плазмид. Необходимость такого механизма для этих плазмид очевидна, так как вероятность их потери при случайном распределении по делящимся клеткам очень велика. Сегрегация бесплазмидных клеток ведет к их накоплению в клеточной популяции из-за большей скорости их удвоения по сравнению с клетками, содержащими плазмиды. Еще более сложна эта проблема для бактериальных клеток. У них выработался специальный механизм ее решения (см. обзор Niraga, 1992), суть которого заключается в связывании дочерних ДНК с помощью специального белка со специфическими сайтами на цитоплазматической мембране, направляющими расхождение ДНК при делении клеток. Сходный механизм используют и плазмиды, но у них для этого есть собственные белки Par (partition) и свой сайт на мембране, а также предназначенный для связывания сайт на плазмидной ДНК (рис. 3.3). Предполагается,

что для белков *Par* определенной плазмиды на мембране имеется только один сайт, поэтому с ним может связаться лишь одна пара разделяющихся молекул ДНК. Следовательно, плазмиды, имеющие одинаковые или сходные гены *par*, несовместимы.

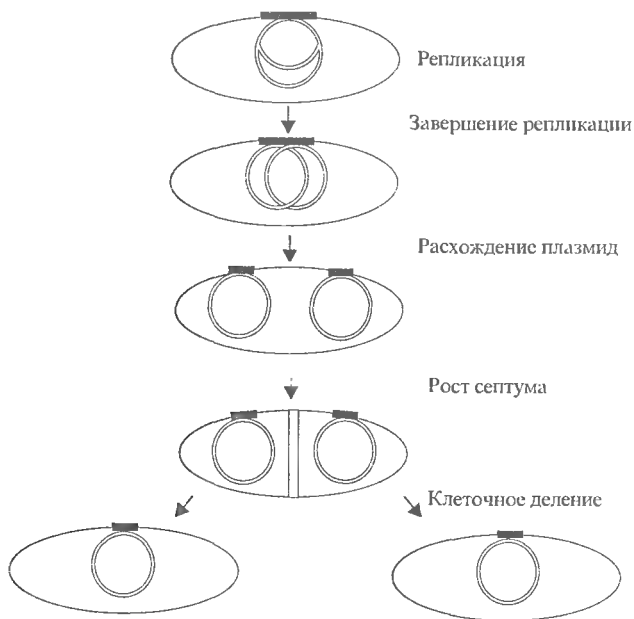


Рис. 3.3. Механизм распределения плазмид по дочерним клеткам.

Жирной линией выделен гипотетический сайт на цитоплазматической мембране, к которому прикрепляются плазмиды с помощью *Par*-белков

Мультикопийные плазмиды распределяются по дочерним клеткам случайным образом. Казалось, это не должно вызывать серьезных проблем, так как уже при числе копий более 10^6 вероятность сегрегации бесплазмидных клеток менее 10^{-6} . Однако известно, что у плазмид благодаря гомологической рекомбинации могут образовываться коинтеграаты, содержащие несколько плазмидных геномов. Это свойство плазмид приводит к уменьшению числа плазмидных репли-

конов в клетке и грозит вызвать их дестабилизацию. В данном случае стабильность плазмид поддерживается механизмом разрешения коинтегратов. Он обеспечивается сайт-специфической рекомбинацией между геномами, входящими в коинтеграаты, в результате чего они распадаются на моногеномные репликоны (рис. 3.4).

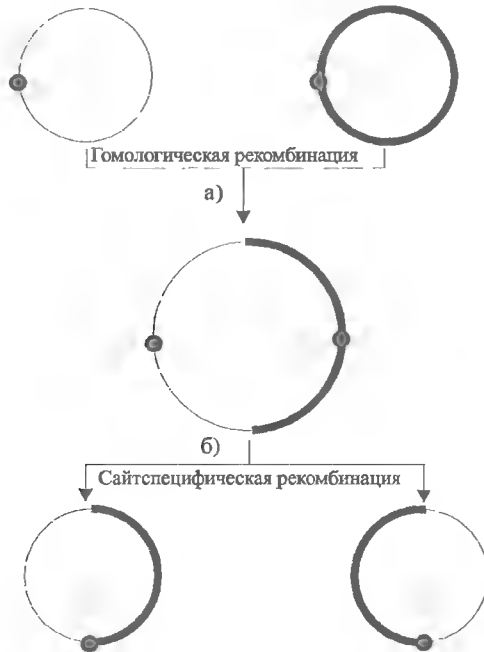


Рис. 3.4. Механизм разрешения коинтегратов: а — образование коинтеграта; б — разрешение коинтеграта
● — сайт разрезания коинтеграта

Своеобразным способом стабилизации популяции клеток, содержащих некоторые плазмиды, является постсегрегационная гибель бесплазмидных бактерий. Это явление основано на том, что такие плазмиды синтезируют одновременно ядовитое для клеток вещество и противоядие к нему. Яд стоек, а противоядие нестойко, поэтому необходим его постоянный синтез, что возможно только в присутствии плазмиды. В клетках, потерявших

плазмиду, яд демаскируется и убивает клетки (рис. 3.5). Яд представляет собой белок, имеющий разные мишени у различных плазмид, а противоядие — либо также белок, либо асРНК, действующая против транскрипта “ядовитого” гена.

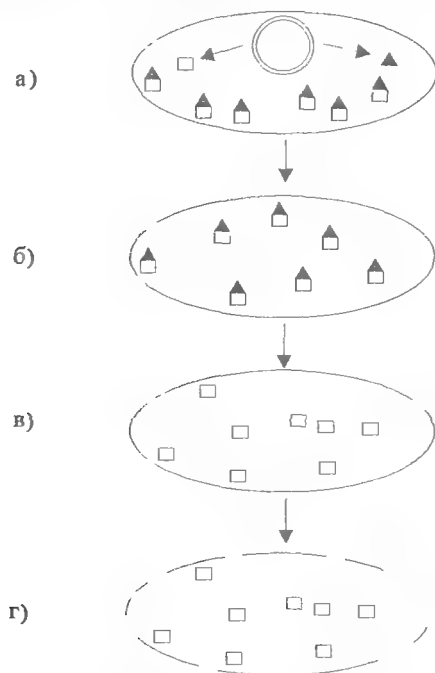


Рис. 3.5. Механизм гибели клеток, потерявших плазмиды: под контролем плазмиды (а) синтезируется одновременно яд (□) и противоядие (▲); при потере плазмиды (б) противоядие быстро распадается (в), и клетка погибает (г)

Фенотипические признаки. Плазмиды придают клеткам различные фенотипические признаки: устойчивость к антибиотикам (ампициллину, тетрациклину, хлорамфениколу и т. д.; всего более 20), катионам (висмута, кадмия, кобальта, ртути, свинца, сурьмы), анионам (арсенату, арсениту), мутагенам (акридинам, этидиум-бромиду, УФ-свету), бактериоцинам. Клетки с плазмидами способны: вы-

зывать биodeградацию камфоры, ксилола, нафталина, никотин-никотината, *n*-алканов, салицилата, толуола; синтезировать антибиотики, бактериоцины, гемолизин, инсектициды, пигменты, поверхностные антигены, сероводород, токсины, фибринолизин; использовать в качестве источника углерода различные сахара и необычные аминокислоты; конъюгировать с реципиентными штаммами бактерий; индуцировать опухоли у растений; осуществлять рестрикцию и модификацию ДНК. Плазмиды, которые не выявляются по фенотипическим признакам, называют криптическими.

Итак, основными биологическими свойствами плазмид являются их способность к репликации, конъюгативность, интегрируемость, несовместимость, стабильность и фенотипические признаки, которые они придают бактериям. Рассмотрим, как эти свойства обуславливаются генетическими особенностями плазмиды F, а также некоторых наиболее изученных представителей семейств R- и Col-плазмид.

F-плазида

Генетика. Плазида *f* представляет собою малокопииную конъюгативную эписому клеток *E. coli* K-12, относящуюся к IncF1-группе несовместимости и обладающую строгим контролем репликации. Размер ее кольцевой ДНК составляет около 100 т.п.н., у нее идентифицировано около 60 генов (рис. 3.6). Попадая в клетки, эта плазида изменяет их фенотипические свойства. Клетки приобретают пили и чувствительность к фагам MS2, f1 и f2 (для них пили являются рецепторами), а также становятся донорами ДНК и блокируют конъюгационный перенос в них чужой ДНК (явление поверхностного исключения).

В районе генома с координатами 47—53 т.п.н. располагаются гены и сайты, ответственные за стабильное поддержание F-плазмиды в клетках, в частности, за вегетативную репликацию (*rep*-область) и распределение молекул плазмидной ДНК по дочерним клеткам (*par*-область). Этот участок, вычлененный из F ДНК, сохраняет все репликативные свойства и свойство несовместимости исходной плазмиды, поэтому его назвали мини-F-плазмидой. В нем имеются два *ori*-сайта. В сайте *ori V* с помощью продукта гена *repC* иницируется двунаправленная репликация, но основную роль играет сайт *oriS*, с которого начинается однонаправленная репликация. Рядом с *oriS*-сайтом располагается

ген *repE*, продукт которого необходим для инициации репликации и контроля числа копий плазмиды. Необычным является тот факт, что промотор этого гена распознается σ^{32} -субъединицей бактериальной РНК-полимеразы. Свою функцию RepE-белок выполняет, связываясь с 19-членными повторами, расположенными в локусах *incB* и *incC*, а также в промоторе собственного гена (рис. 3.7). Действуя на те же локусы входящей плазмиды, этот белок блокирует ее репликацию, что приводит к явлению несовместимости F-плазмид.

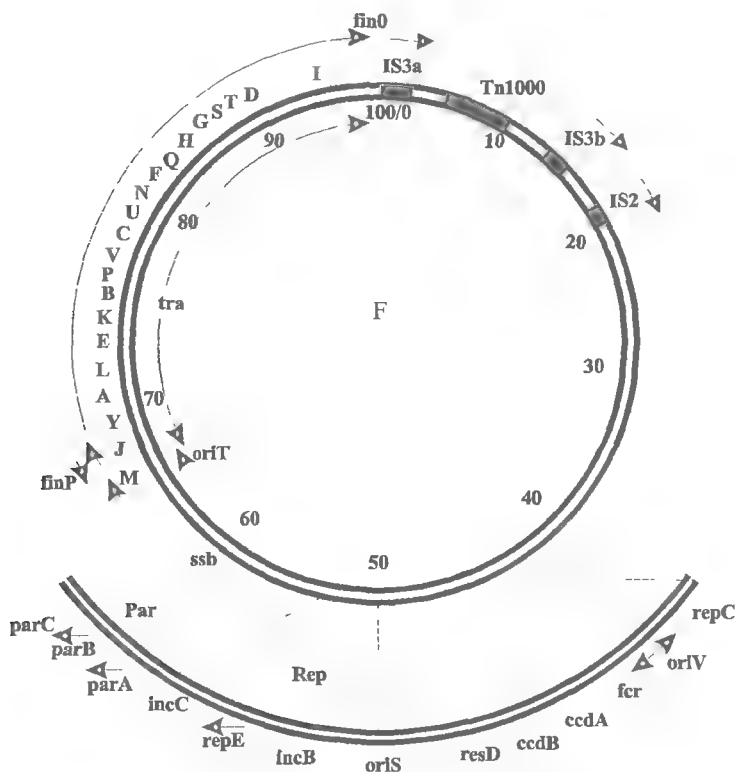


Рис. 3.6. Генетическая карта F-плазмиды.

Стрелка в *oriT* — направление переноса ДНК при конъюгации; стрелки в *oriV* — направление репликации; стрелки над генами — направление их транскрипции; координаты даны в т.п.н.

Распределение F ДНК по дочерним клеткам ведут продукты, кодируемые областью *par*. Она включает два гена *par* и сайт *parC*. Через этот сайт, по-видимому, плазмидная ДНК связывается с помощью белков Par с определенным участком цитоплазматической мембраны. Конкуренция сайтов *parC*, принадлежащих резидентной и вошедшей плазмидам, приведет к потере одной из них, что также проявится в виде их несовместимости.

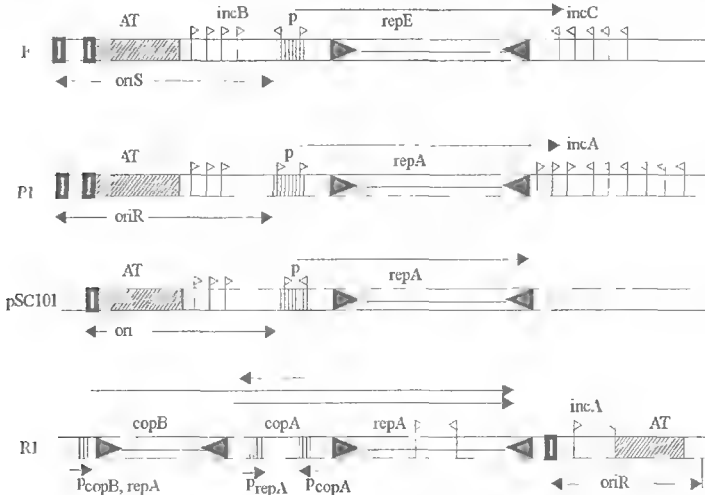


Рис. 3.7. Строение *rep*-локусов плазмид F, P1, pSC101 и R1.

p — промотор (вертикальная штриховка); — *dnaA*-бокс; флажок — повтор, связывающий RepE- или RepA-белок (направление флажка указывает на ориентацию повтора); ► — иницирующий кодон; ◄ — терминирующий кодон; AT—AT-богатый участок. Стрелки над промоторами и генами указывают на направление транскрипции

Мини-F-плазмида содержит информацию и о других функциях, стабилизирующих плазмиду. Продукт гена *resD* ведет разрешение коинтеграгов через сайт *fcr*. Гены *ccd* отвечают за постсегрегационную гибель бесплазмидных клеток (Jaffe *et al.*, 1985). Ген *ccdB* кодирует белок (яд), инактивирующий субъединицу A гиразы, что приводит к появлению двунитевых разрывов в бактериальной ДНК. В плазмидосодержащих клетках продукт гена *ccdA*, соединяясь с

белком CcdB, противодействует этому. При потере плазмиды белок CcdA за 2—3 генерации клеток расщепляется протеазой Lon, вследствие чего клетки гибнут.

Конъюгативность. За конъюгативные свойства F-плазмиды отвечает оперон *tra*, содержащий более 25 генов (см. рис. 3.6), которые функционально делятся на два блока. Один блок, названный *mpf* (mating pair formation, гены от *traA* до *traG*), отвечает за установление физического контакта между донором и реципиентом и образование поры (мостика) между ними. Первичный контакт обеспечивается кончиками пилей, основным белок которых — пилин — кодируется геном *traA*. К этому же блоку, по-видимому, следует отнести и гены *traT* и *traS*, отвечающие за поверхностное исключение. Второй блок генов — *traMYDI* — детерминирует передачу ДНК в реципиентные клетки. Это осуществляется путем введения эндонуклеазой (никазой) TraY одностороннего разрыва (ника) в сайт *oriT*, расплетения нитей ДНК геликазой TraI и перемещения нити с 5'-конца в реципиентную клетку так, что оперон *tra* передается последним. По мере переноса эта нить дуплицируется в реципиенте. Интересно отметить, что восстановление дуплекса в донорной клетке идет не по механизму катящегося кольца, хотя для этого имеется свободный 3'-конец, а путем инициации синтеза новой нити ДНК, которая замещает передающуюся нить (рис. 3.8).

У F-подобных плазмид экспрессия оперона *tra* позитивно регулируется геном *traI*, продукт которого включает независимо транскрипцию гена *traM* — инициатора переноса плазмидной ДНК и оперон из генов *traY—traI*. В свою очередь экспрессия гена *traI* негативно регулируется асРНК, кодируемой геном *finP*. Экспрессию же гена *finP* позитивно регулирует продукт гена *finO*. Впрочем, *tra*-оперон самой F-плазмиды экспрессируется конститутивно, что объясняется инактивацией гена *finO* элементом IS3a.

Структурными компонентами, обеспечивающими интеграцию F-плазмиды в бактериальную хромосому, являются элементы IS2, IS3a, IS3b и Tn1000, входящие в состав плазмидной ДНК. Они взаимодействуют с аналогичными элементами бактериальной ДНК через сайт-специфическую или RecA-зависимую рекомбинацию и встраиваются в нее в разных местах и направлениях в зависимости от локализации и направления бактериальных элементов

(рис. 3.9, *а, б, в*). Клетка после интеграции в ее хромосому F-плазмиды приобретает свойства Hfr-клетки (рис. 3.10), т. е. способна с высокой частотой ориентированно передавать свои гены в реципиенты. Это пример генной инженерии *in vivo*, осуществляющийся в природе с помощью плазмид.



Рис. 3.8. Механизм конъюгации между донорной и реципиентной клеткой (Kornberg, Baker, 1992)

Образование F' -плазмид. Другим примером природной генной инженерии служит процесс образования F' -плазмид, т. е. F-плазмид, содержащих бактериальные гены. Эти плазмиды образуются при случайном неправильном исключении интегрированной F-плазмиды из бактериальной хромосомы. Образование F' -плазмиды в результате внутримолекулярной рекомбинации, происходящей по флангам интегрированной плазмиды иллюстрирует рис. 3.9, *в, г*. В этом случае F' -плазида не повреждается и сохраняет конъюгативные свойства. В таких плазмидах бактериальная и плазмидная ДНК разделяются прямыми повторами IS-элементов. Если при вычленении F' -плазмиды из бактериальной хромосомы оперон *tra* делетируется хотя бы частично, образовавшаяся F' -плазида будет неконъюгативной. В любом случае F' -плазида для сохранения репликонных свойств должна содержать область *rep*. Первой

найденной F'-плазмидой была плазмида F' *lac*. С ее помощью была образована коллекция Hfr-клеток серии ЕС (см. рис. 3.10).

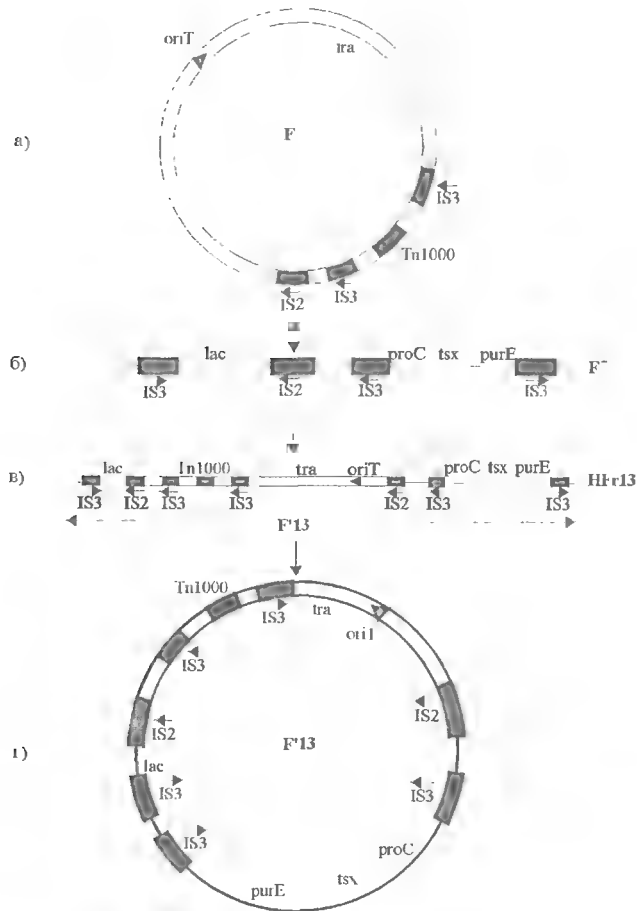


Рис. 3.9. Механизм образования клеток Hfr13 и плазмиды F'13: *а* — F-плазмида; *б* — *lac*-участок бактериальной хромосомы; *в* — тот же участок с интегрированной через IS2-элемент F-плазмидой; *г* — плазмида F'13, образованная при неправильном исключении F-плазмиды из хромосомы клеток Hfr13.

Стрелка в *oriT* — направление переноса ДНК при конъюгации; плазмидная ДНК выделена двойной линией

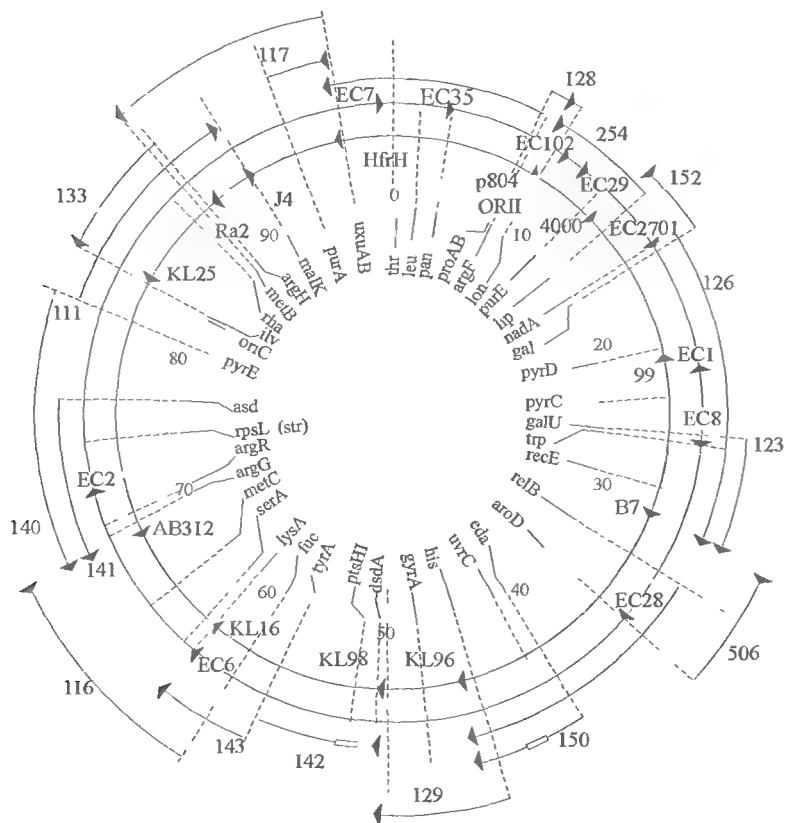


Рис. 3.10. Генетические карты *E. coli* К-12 (внутреннее кольцо), Hfr-штаммов, образованных интеграцией F-плазмиды (среднее кольцо), Hfr-штаммов, образованных интеграцией F'*lac*-плазмиды (внешнее кольцо) и F'-плазмид (внешние сегменты).

Указаны названия генов и штаммов. Стрелки у среднего и внешнего колец — направление передачи хромосомы; стрелки внешних сегментов — направление в них *oriT*-сайта; $\square$ — делеция. Нумерация внешних сегментов соответствует названиям F'-плазмид, а размер — переносимому участку бактериальной хромосомы. Координаты даны в минутах.

Po Holloway, Low, 1987; Umeda, Ohtsubo, 1989

Частота спонтанного образования F'-плазмид из клеток Hfr не превышает 10^{-5} . Поэтому было разработано несколько методов

их селективного выделения, одним из которых является метод Лоу. Он сводится к осуществлению конъюгации клеток Hfr, у которых F-плазмида локализуется рядом с нужным геном, с клетками F⁻*recA*⁻, содержащими необходимые для селекции F'-плазмид мутации. При этом в некоторых реципиентных клетках благодаря наличию генов F-плазмиды в донорном фрагменте хромосомы происходит его превращение в самостоятельный репликон. Клетки с нужными репликонами (F'-плазмидами) отыскиваются на селективных средах, причем мутация *recA* исключает отбор рекомбинантов. Подобным образом была создана коллекция F'-плазмид, перекрывающих всю хромосому клеток *E. coli* (см. рис. 3.10).

Разработан и более универсальный метод получения плазмид, содержащих бактериальные гены. Он предусматривает использование фага Mu. При вегетативном развитии этого фага в клетке образуются гетерогенные кольцевые молекулы длиной до 150 т.п.н., включающие фрагменты бактериальной ДНК и хромосому фага. Если в клетке в момент инфекции фагом или индукции профага присутствует конъюгативная плазмида, находящаяся в автономном или интегрированном состоянии, то она может образовать коинтегра́т с гетерогенной кольцевой молекулой ДНК, представляющий собой F'-плазмиду. Эту плазмиду сохраняют путем конъюгации гибнущих клеток с клетками F⁻*recA*⁻. С помощью данного метода получают F'-плазмиды, несущие любые комбинации бактериальных генов, так как коинтегра́т может состоять из нескольких гетерогенных кольцевых молекул ДНК.

Перенос бактериального фрагмента ДНК конъюгативной плазмидой возможен и в том случае, когда между ними нет стабильной связи. Например, F-плазмида при конъюгации переносит с частотой около 10⁻⁵ любой бактериальный ген в реципиентную клетку, где он интегрируется в ДНК реципиента с помощью RecA-зависимой рекомбинации и в плазмиде не присутствует. Это явление, получившее название мобилизации хромосомы, осуществляется благодаря RecF-зависимой рекомбинации.

R-плазмиды

Рассмотрим только R-плазмиды группы несовместимости IncFII. Из данной группы наиболее изучены конъюгативные плазм-

миды со строгим контролем репликации — R1 и R100, размер которых около 90 т.п.н. Первоначально они были изолированы из клеток *Shigella*, но легко переносятся и поддерживаются в клетках *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus* и *Salmonella*. Геномы их устроены сходным образом, что позволяет составить обобщенную генетическую карту этих плазмид (рис. 3.11). Обе плазмиды относятся к классу плазмид с множественной лекарственной устойчивостью и содержат гены, определяющие резистентность клеток к хлорамфениколу, стрептомицину, спектиномицину, сульфаниламидам и фузидовой кислоте. Кроме того, плазида R1 несет детерминанты устойчивости к канамицину и ампициллину, а плазида R100 — к тетрациклину и ионам ртути. Эти гены входят в состав различных транспозонов и почти все располагаются в одной области (*r-det*), ограниченной прямыми повторами IS1-элементов, которая у плазмиды R100 представляет собой транспозон Tn 2671. Благодаря этому область *r-det* может переноситься в другие плазмиды.

Вторая часть R-плазмид, называемая RTF (resistance transfer factor), может быть самостоятельной конъюгативной плазмидой, содержащей ген Tc^R . Локализуемый в ней *tra*-оперон обладает 90%-ной гомологией с *tra*-опероном F-плазмиды. (Это еще раз подчеркивает роль природных генно-инженерных операций: некогда найденная удачная комбинация генов переносится блоком в ДНК других объектов и используется там в том же качестве.) В этой же части располагаются гены и сайты, отвечающие за репликацию (*repA*) и несовместимость (*incA*) плазмид, а также за постсегрегационную гибель бесплазмидных клеток (*parD*).

Контроль числа копий у плазмид R1 и R100 осуществляется так же, как и у плазмид F, P1 и pSC101, путем поддержания концентрации белка RepA на заданном уровне с помощью связывания этого белка с итеронами, находящимися в сайтах *inc* (см. рис. 3.7). Однако в данном случае контроль транскрипции гена *repA*, имеющего два промотора, ведет локус *cop*. Дальний промотор, кроме синтеза белка RepA, обеспечивает еще и синтез белка CopB, являющегося репрессором транскрипции с ближнего промотора. А транскрипт гена *copA* осуществляет дополнительный контроль, действуя как антисмысловая РНК против обоих мРНК. Баланс всех этих реакций и приводит к строгому контролю репликации R-плазмид.

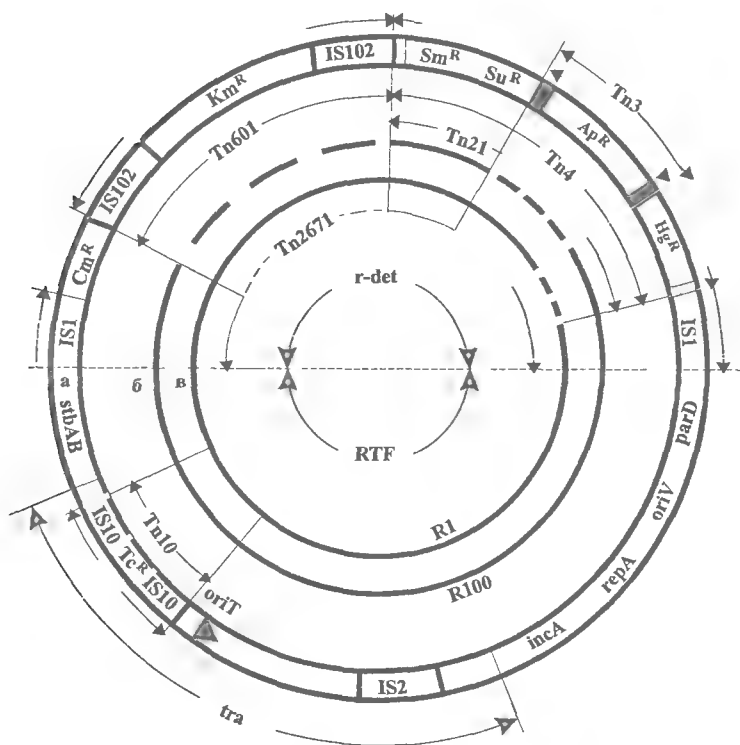


Рис. 3.11. Строение R-плазмид группы несовместимости IncFII:
 а — обобщенная карта; б — плаزمид R100; в — плазмид R1.
 Стрелки над IS-элементами обозначают их ориентацию; стрелка
 в *oriT* — направление переноса ДНК при конъюгации; пунктир —
 делецию

Локус *stb*, отвечающий за распределение плазмид R1 и R100 по дочерним клеткам, организован так же, как и *par*-локус плазмид F и P1 (см. рис. 3.6). Имеется у них также и механизм постсегрегационной гибели бесплазмидных клеток, представленный генами *hok* (host killing) и *sok* (suppressor of *hok*). Здесь противоядием является нестойкий нетранслируемый транскрипт гена *sok*, действующий как асРНК против мРНК гена *hok*. Образующийся дуплекс разрушает-

ся РНКазой III, что уберегает клетки от гибели, пока в них есть плазида. Еще одна система стабилизации плазмид R1 и R100 расположена в локусе *parD*, содержащем гены *kid* (killing determinant) и *kis* (killing suppression). Мишенью белка Kid является репликационная геликаза DnaB, что в бесплазмидных клетках ведет к остановке синтеза ДНК и ингибированию клеточного деления.

Большое количество транспозонов в плазмидах группы IncF II обуславливает нестабильность последних в некоторых видах клеток. Например, плазмиды, перенесенные из клеток *E. coli* K-12 в клетки *Proteus mirabilis*, распадаются на части, содержащие элементы RTF с интегрированными в них теми или иными транспозонами. Благодаря подвижности транспозонов плазмиды, обладающие множественной лекарственной устойчивостью, могут вычленять близкие им по свойствам дочерние плазмиды, образуя тем самым целые семейства. Плазмиды, входящие в состав одного семейства, отличаются комбинациями маркеров устойчивости к антибиотикам. Именно такое семейство составляют плазмиды группы несовместимости IncF II.

Плазида ColE1

Эта неконъюгативная плазида *E. coli* относится к классу плазмид с ослабленным контролем репликации. Размер плазмиды ColE1 6,65 т.п.н., число копий на клетку — около 20. Ее ген *sea* определяет синтез колицина E1, вызывающего деполяризацию цитоплазматической мембраны и гибель клеток. Плазмидный ген *imm* обеспечивает клетке иммунитет к действию этого колицина. Синтез колицина в норме репрессирован, но индуцируется агентами, влияющими на метаболизм ДНК.

Локус плазмиды ColE1, ответственный за репликацию, расположен около *oriV*-сайта, с которого начинается однонаправленная репликация плазмиды (рис. 3.12), целиком зависящая от бактериальных белков. В нем имеется два промотора, с одного из которых в направлении к *ori*-сайту стартует транскрипт РНК II, терминирующийся после прохождения *oriV*-сайта. Известно, что по мере синтеза нить мРНК вытесняется из транскрипционной петли (R-петли) самой РНК-полимеразой. РНК II также вытесняется по всей своей длине, кроме области, комплементарной

ori-сайту, где благодаря специфике нуклеотидной последовательности дуплекс ДНК—РНК, образовавшийся в процессе транскрипции, не разрушается. Такие дуплексы распознаются РНКазой H, которая гидролизует в них РНК. И в данном случае РНК II процессируется в *ori*-сайте, а образовавшийся транскрипт длиной 555 п.н. служит праймером для инициации репликации ДНК-полимеразой I по лидирующей нити. Синтез ДНК по комплементарной нити начинается со сборки праймосомы на сайте *pas* (primosome assembly site), расположенном на расстоянии 150 нуклеотидов от *oriV*-сайта. Еще далее (400 нуклеотидов от *oriV*-сайта) в другом сайте *pas* на лидирующей нити происходит смена ДНК-полимеразы I на ДНК-полимеразу III. Сформировавшаяся таким образом репликационная вилка осуществляет один раунд репликации.

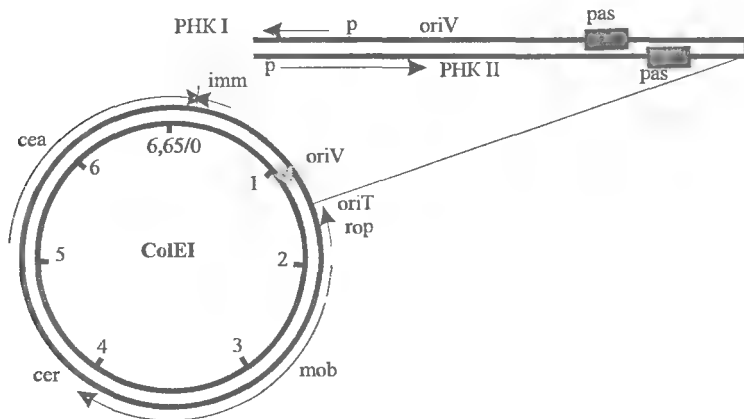


Рис. 3.12. Генетическая карта плазмиды ColEI.

Стрелки над генами — направление их транскрипции; стрелка у *oriV* — направление репликации ДНК; горизонтальные стрелки — направление транскриптов РНК I и РНК II; p — промотор. Координаты даны в т.п.н.

Негативный контроль числа копий осуществляют два плазмидных фактора. Это, прежде всего, транскрипт РНК I (108 п.н.), образующийся со второго промотора и комплементарный 5'-концу транскрипта РНК II. Дуплекс РНК I—РНК II стерически

препятствует образованию дуплекса ДНК—РНК II в области *oriV*-сайта, блокируя тем самым инициацию нового раунда репликации. Количество плазмидных копий регулируется также геном *rop* (RNA organizing protein), продукт которого повышает скорость образования дуплекса РНК I—РНК II.

Транскрипт РНК I может блокировать репликацию ряда родственных мультикопийных плазмид, обуславливая их несовместимость с плазмидой ColE1. Отметим здесь, что механизм несовместимости плазмид, осуществляемый с помощью антисмысловых РНК, очень гибок. В принципе достаточно изменения у входящей плазмиды одного нуклеотида в области образования дуплекса РНК I—РНК II, чтобы воспрепятствовать его образованию и сделать, таким образом, плазмиды совместимыми.

Возможная нестабильность, вызываемая мультимеризацией, у плазмиды ColE1 предотвращается присутствием в ее геноме локуса *cer*, продукт которого “разрезает” мультимеры в специфических сайтах.

Плазмида ColE1 может быть мобилизована любой конъюгативной плазмидой, что свидетельствует о независимости процессов мобилизации и конъюгации. Процесс мобилизации состоит из нескольких этапов: введение ника в сайте *oriT* (прежнее название *bom*) плазмидной ДНК, “пилотирование” 5'-конца разорванной нити к предобразованному конъюгационному мостику, перенос нити в реципиент, восстановление целостности плазмиды в донорной клетке и, возможно, инициация синтеза комплементарной нити в реципиентной клетке. У ColE1 за этот процесс отвечают четыре белка, кодируемые перекрывающимися генами в области *mob* (Boyd *et al.*, 1989).

Плазмиды с широким кругом хозяев

Рассмотрим свойства конъюгативной плазмиды RK2 и неконъюгативной RSF1010 — представителей групп несовместимости IncP1 и IncQ, соответственно. Каков механизм, который позволяет им стабильно поддерживаться почти во всех грамотрицательных бактериях, а плазмиде RK2, кроме того, еще и конъюгировать с грамположительными клетками и дрожжами

(Heinemann, Sprague, 1989)? Полного ответа на этот вопрос пока нет, но ясна общая идея этого механизма.

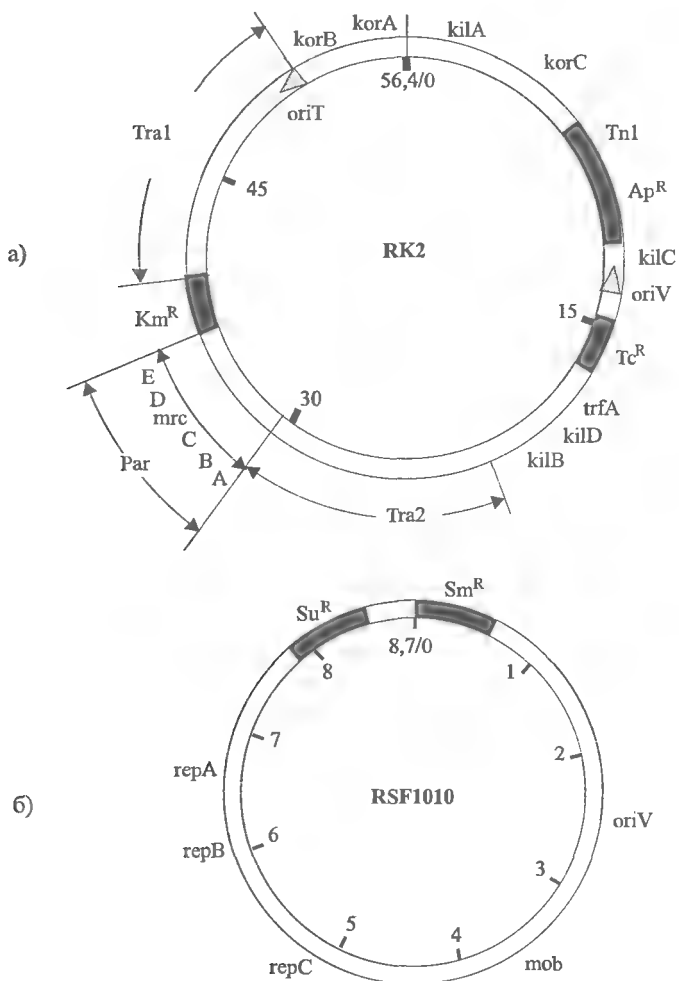


Рис. 3.13. Строение плазмид с широким кругом хозяев:

a — плазмиды RK2; *б* — плазмиды RSF1010.

Стрелки у *oriV* и *oriT* — направление репликации и переноса ДНК, соответственно. Координаты даны в т.п.н.

Плазмида RK2. Эта плазмида размером 60 т.п.н., (рис. 3.13,а) и близкородственные плазмиды RP1 и RP4 имеют относительно невысокую копийность — 5—8 молекул на бактериальную хромосому. Механизм строгого контроля числа копий у них более сложен, чем у плазмид F и R1. Минимально достаточный репликон состоит из *oriV*-сайта и гена *trfA*, кодирующего в одной рамке два инициаторных белка, которые связываются с итеронами в *oriV*-сайте. Для инициации репликации, идущей в одном направлении, нужен также белок DnaA, мишень которого — *dnaA*-бокс — находится тоже в *oriV*-сайте. Вспомогательную роль играют опероны *kil* и *kor*, которые предположительно обеспечивают неизвестным пока способом нечувствительность плазмиды к смене хозяев. Известно лишь, что продукты генов *korA* и *korB* подавляют транскрипцию гена *trfA*, но этому препятствует продукт гена *kilD*. Элонгацию репликации ведут бактериальные белки.

Такая гибкая схема снижает зависимость числа копий плазмиды от концентрации белка TrfA. В ней заложены возможности для инициации репликации в разных семействах клеток. Малый TrfA белок используется в *E. coli*, а большой — в *P. aeruginosa*. Инсерционная мутация между итеронами и *dnaA*-боксом подавляет репликацию в *E. coli*, но не в *P. aeruginosa*. Делеция двух итеронов в *inc*-сайте увеличивает число копий в *Agrobacterium tumefaciens*, но не в *E. coli*. Небольшая делеция участка, прилегающего к *oriV*-сайту и нужного для посадки какого-то бактериального белка, блокирует репликацию в *E. coli*, но не в *A. tumefaciens*.

В стабильность плазмиды различный вклад вносят гены локусов *par*, *kil*, *kor* и даже транспозон Tn1. Лocus *par* состоит из двух авторегулируемых противоположно направленных оперонов — *parCBA* и *parDE*. Белки ParB и ParC, возможно, обеспечивают распределение плазмид по дочерним клеткам, а белок ParA является резольвазой, которая разрешает коинтеграаты через сайт *mrs* (multimer resolution site), находящийся в промоторе гена *parC*. Белки оперона *parDE* функционально и структурно сходны с белками Csd плазмиды F. Токсичным является белок ParE, который, правда, не убивает клетки, а вызывает их филаментацию; белок ParD нейтрализует его действие. И в этом случае сравнительная значимость оперонов зависит от клетки-хозяина. Делеция оперона *parCBA* не влияет на стабильность плазмиды в *E. coli*, *A. tumefaciens*, *Azotobacter vinelandii*,

но существенно дестабилизирует плазмиду в *P. aeruginosa* и в *Acinetobacter calcoaceticus*. Делеция локуса *parDE* не существенна в *A. calcoaceticus*, но сказывается в *A. vinelandii*. Конкретная роль оперонов *kil* и *korB* в стабилизации плазмиды до конца не выяснена. Два белка оперона *korA* гомологичны белкам *ParA* и *ParB* плазмиды F, сходны и сайты их действия. Это позволяет предположить возможность их участия в распределении ДНК по дочерним клеткам. Резольваза *TnpR* и сайт *res* транспозона *Tn1* способствуют разрешению плазмидных коинтеграгов.

Конъюгативность плазмиды RK2 обеспечивается локусами *tra1* и *tra2*. В первом содержатся *oriT*-сайт и гены, инициирующие перенос ДНК. Второй локус обеспечивает Mpf-функцию, т. е. ответственен за установление физического контакта между донорной и реципиентной клеткой. Отметим, кстати, что с помощью этой плазмиды был достигнут существенный прогресс в понимании механизма ретроконъюгации. Так названо явление переноса генов (плазмидных или хромосомальных) из реципиентных клеток в донорные. В опытах на *E. coli* (Sia *et al.*, 1996) донорные клетки содержали плазмиду RK2, а реципиентные клетки — плазмиду pEKA28 (IncQ Mob⁺). За 24 часа контакта почти все реципиентные клетки приобрели плазмиду RK2, а у 0,4 % донорных клеток была обнаружена плазида pEKA28. При замене плазмиды RK2 на ее вариант с дефектом в *oriT*, который блокирует акт переноса плазмиды, но не образование конъюгационного мостика, эффект полностью пропал. Таким образом, во втором случае мобилизуемая плазида pEKA28 “не воспользовалась” образовавшимся каналом переноса. Предполагается, что перенесенная в первом случае плазида pRK2 изменила пол реципиентных бактерий на противоположный и побудила их образовать новый конъюгационный мостик или переориентировать старый.

Отмечено также позитивное влияние *tra*-оперона на стабильность плазмиды: популяция клеток с дефектным *tra*-опероном содержит заметно большую долю бесплазмидных бактерий (Sia *et al.*, 1995).

Плазида RSF1010. Эта плазида детерминирует устойчивость к стрептомицину и сульфонамидам (рис. 3.13,б). Несмотря на свой относительно небольшой размер (8,68 т.п.н.) она кодирует, кроме инициаторного белка RepC, который связывается с *oriV*-сайтом,

праймазу RepB и геликазу RepA. Из бактериальных белков ею используется только ДНК-полимераза III. Плазмида RSF1010 неконъюгативна, но эффективно мобилизуется конъюгативными плазмидами почти во все виды клеток, включая грамположительные (Gormley, Davies, 1991). Для этого у нее имеются три гена *mob* (mobilization) и сайт начала переноса *oriT*. У плазмиды отсутствует *par*-локус, так как она мультикопийна (15—40 копий).

Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*

Агробактерии *A. tumefaciens* вызывают появление корончатых галлов (опухолей) у двудольных растений (см. гл. 5). Вирулентность этих бактерий зависит от содержащихся в них конъюгативных Ti-плазмид (Ti — tumor-inducing) размером от 140 до 250 т.п.н. В процессе инфекции фрагмент этих плазмид размером около 25 т.п.н., называемый Т-ДНК, переносится в растительные клетки и ковалентно связывается с ядерной ДНК. Гены, располагающиеся на Т-ДНК, активно транскрибируются, вызывая не только неконтролируемый рост трансформированных растительных клеток, но и появление в них необычных аминокислот — октопина, нопалина и других опинов. Октопин состоит из аргинина и пировиноградной кислоты, а нопалин представляет собой соединение аргинина и α -кетоглутаровой кислоты. Эти аминокислоты могут использоваться бактериями *A. tumefaciens* в качестве источника углерода, азота и энергии, если они содержат Ti-плазмиды, которые несут информацию об их катаболизме. Интересно отметить, что опины являются индукторами *tra*-оперона Ti-плазмид, способствуя их переносу в бесплазмидные клетки агробактерий.

Существует несколько типов Ti-плазмид, отличающихся друг от друга структурой опинов, синтезируемых ими в растительных клетках. Лучше всего изучены октопиновые и нопалиновые плазмиды, имеющие одинаковое строение (рис. 3.14,а). Октопиновые плазмиды содержат информацию о синтезе и расщеплении октопина и агропина, а нопалиновые — нопалина и агроцинопина. Гены синтезас находятся в Т-ДНК, а гены, осуществляющие катаболизм этих опинов, — вне ее. Такое расположение генов синтеза и распада опинов соответствует их биологическому назначению: синтез опинов ведут опухолевые клетки, содержащие Т-ДНК, а их деградацию — клетки *A. tumefaciens*, обладающие Ti-плазмидами.

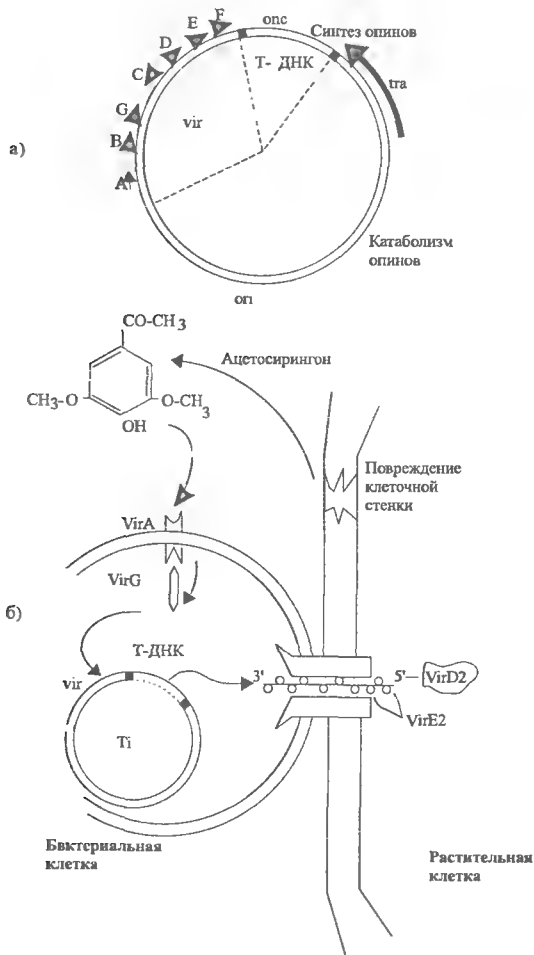


Рис. 3.14. Упрощенная карта Ti-плазмид *A. tumefaciens* (а) и схема переноса Т-ДНК из бактериальной клетки в растительную (б).

Жирные стрелки — направление считывания генов; тонкие стрелки — поток химических сигналов и движение Т-ДНК; ■ — границы Т-ДНК

Т-ДНК ограничены несовершенными прямыми повторами, состоящими из 25 п.н. Для переноса Т-ДНК важен только его правый повтор; делеция левого повтора ведет к переносу всей плазмиды. Признак онкогенности обеспечивается двумя локусами: *onc*, располагающимся в Т-ДНК и содержащим гены онкогенности, а также *vir*, отвечающим за перенос Т-ДНК в растительные клетки. Локусы *vir* у этих плазмид физически гомологичны и взаимозаменяемы. Они включают около 25 генов, организованных в 7 оперонов (см. обзор Winans, 1992). Гены *virA* и *virG* экспрессируются конститутивно. Белок-сенсор VirA, интегрированный во внешнюю мембрану клеток, улавливает ацетосирингон и родственные фенольные производные, которые испускаются поврежденным растением, и передает об этом сигнал цитоплазматическому белку VirG путем его фосфорилирования (рис. 3.14,б). Активированный белок VirG является позитивным регулятором транскрипции других *vir*-генов. Связываясь с их промоторами, он индуцирует их экспрессию. Оперон *virB*, состоящий из 11 генов, детерминирует образование трансмембранного мостика (поры) между бактериальной и растительной клетками. Далее эстафету принимают белки VirD1 и VirD2, которые вырезают нить Т-ДНК с правым 5'-концом, делая ники в прямых концевых повторах; вытесняемая нить покрывается при этом SSB (single-strand binding) — белком VirE2. Белок VirD2 ковалентно связывается с 5'-концом вытесненной нити и направляет ее через пору в растительное ядро. Конечно, и в растительной, и в бактериальной клетках восстанавливается дуплексная форма Т-ДНК.

В трансформированных растительных клетках Т-ДНК активно транскрибируется. мРНК Т-ДНК в растительных клетках устроены аналогично эукариотическим мРНК, т. е. на их 5'-концах находится 7-метилгуанозин, а на 3'-концах — сайты полиаденилирования ААУАА и полиадениловые цепочки. “Эукариотической” особенностью транскрипционного механизма Т-ДНК является и отсутствие в ней оперонов, в то время как в других частях Ti-плазмид опероны есть. Это пока единственный обнаруженный в природных условиях пример функционирования прокариотической нуклеотидной последовательности в эукариотических организмах. Следует полагать, что функциональная часть Т-ДНК за

исключением механизма переноса эволюционно происходит из растений.

Строение Т-ДНК и ее роль в образовании корончатых галлов у растений рассматриваются в гл. 12.

Способностью трансформировать клетки двудольных растений обладают также некоторые плазмидосодержащие штаммы *A. risogenes*. У растений, зараженных этими бактериями, провоцируется образование ткани, которая получила название косматого корня. Поэтому плазмиды, вызывающие этот эффект, называют Ri-плазмидами (root-inducing). Генетические карты Ri-плазмид схожи с таковыми Ti-плазмид. Оба типа плазмид физически гомологичны в области *vir*, т.е. эволюционная близость их несомненна. Инфекционной частью Ri-плазмид также является Т-ДНК.

Плазмиды грамположительных бактерий

Эти плазмиды распадаются на две большие группы — мультикопийные и низкокопийные. Первые характеризуются небольшим размером (несколько т.п.н.), репликацией по механизму катящегося кольца, способностью к мобилизации, широким кругом хозяев (некоторые из них могут поддерживаться даже в граммотрицательных клетках). Прототипом может служить плазида pUB110 (4548 п.н.), выделенная из *Staphylococcus aureus*. Она содержит маркеры устойчивости к неомицину (*neo*) и флеомицину (*fhl*), локус *mob* (мобилизация), ген *repU* (инициатор репликации), в начальной части которого расположен локус *incA*, ответственный за несовместимость плазмид, и два *ori*-сайта (рис. 3.15). Сайт *dso* (double-strand origin) предназначен для инициации репликации в двунитевой форме, а *ssu* (single-strand origin) — в одностанде. Белок RepU, имеющий топоизомеразную активность, распознает сайт *dso* на суперскрученной ДНК, делает в нем ник, связывается ковалентно с 5'-концом разорванной нити и после полного вытеснения этой нити замыкает ее в одностанде кольцо. Здесь на сайте *ssu* иницируется раунд репликации, завершающийся образованием двунитевой плазмидной копии. Вторая молекула плазмидной ДНК образуется в процессе копирования “катящейся” нити. Оба репликативных процесса идут по лидирующей нити, что существенно сокращает их потребность в репликационных ферментах.

Плазмида pUB110 использует бактериальные ДНК-полимеразы III и Pol I, геликазу, лигазу и SSB-белок. Эти белки есть в любой клетке, что и объясняет возможность плазмиды использовать широкий круг хозяев.

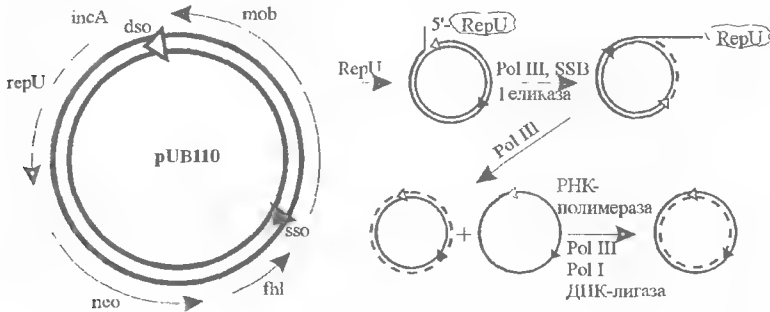


Рис. 3.15. Строение плазмиды pUB110 и схема ее репликации по механизму катящегося кольца.

Стрелки у карты плазмиды — направление считывания генов; стрелки в ori-сайтах — направление одностековой (ssb) и двустековой (dso) репликации; штрихи — синтезируемая нить ДНК.

Обозначения и пояснения даны в тексте

Регуляция числа плазмидных копий происходит путем поддержания концентрации белка RepU на определенном уровне. Это осуществляется тремя путями. Во-первых, асРНК, комплементарная начальной части мРНК гена *repU* подавляет ее трансляцию. Во-вторых, в конце каждого раунда репликации белок RepU теряет топоизомеразную активность и переходит в форму RepU*, не способную инициировать репликацию. В-третьих, димер RepU—RepU* связывается с сайтом *dso*, препятствуя интактным белкам начать репликацию.

В геномах мультикопийных плазмид, представляющих другие семейства (pE194, pT181 и др.), блоки генов, которые отвечают за репликацию, устойчивость к антибиотикам и мобилизацию, расположены сходным образом. Механизм репликации и механизм контроля репликации этих плазмид отличаются лишь деталями. Некоторые плазмиды имеют расширенный круг хозяев — они развиваются как в грамположительных, так и в грамотрицательных клетках. Плазмида pC194 из *S. aureus* является своеобразным

“чемпионом” в этом отношении — она может реплицироваться даже в клетках низших эукариот — дрожжах (Goursot *et al.*, 1982).

Свойства низкокопийных плазмид сходны со свойствами подобных плазмид грамотрицательных бактерий. Они реплицируются в тета-форме и содержат локусы, поддерживающие их стабильное существование в клетках. Некоторые из них являются конъюгативными.

Линейные плазмиды

Полная репликация линейных молекул ДНК обеспечивается благодаря специфической структуре их концов, называемых теломерами. Этот термин был введен для обозначения концов хромосом у эукариот, а после открытия линейных плазмид стал применяться и для названия их концов. У линейных плазмид известно два типа теломер — открытые концы и ковалентно замкнутые (закрытые), но в обоих случаях концевые структуры представлены инвертированными повторами. Первый тип характеризуется присутствием концевого белка, ковалентно соединенного с 5'-концом каждой нити (см. рис. 3.1,б), а второй — наличием на обоих концах шпильки, замыкающей ковалентно обе нити ДНК (см. рис. 3.1,в).

Линейные плазмиды с первым типом теломер были впервые выявлены у почвенных бактерий *Streptomyces*, а затем были найдены в цитоплазме, митохондриях и хлоропластах многих эукариотических клеток — грибов, водорослей и высших растений. Такие теломеры имеются также у некоторых бактериальных и животных вирусов (см. обзор Hinnebusch, Tilly, 1991). Именно с их помощью был выяснен механизм репликации ДНК этого типа и выявлена праймирующая роль концевого белка в этом процессе.

Второй тип теломер сначала был обнаружен у вируса осповакцины, а первым примером прокариотической ДНК подобного строения явился плазмидный профаг N15 (Сварчевский, Рыбчин, 1984). Этот объект открыл новый подраздел в классификации прокариотических плазмид, в котором значатся еще только плазмиды спирохет *Borrelia burgdorferi*, описанные позже (Barbour, Garon, 1987). Строение теломер этих плазмид представлено на рис. 3.16. Подобные плазмиды найдены в митохондриях некоторых грибов и хлоропластах растений. Механизм их репликации неизвестен.

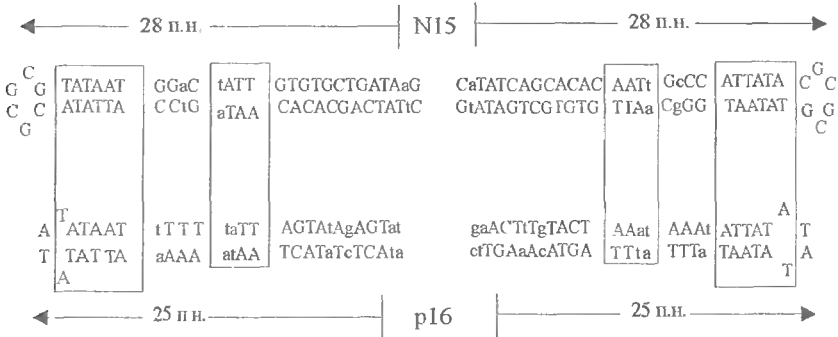


Рис. 3.16. Строение теломер линейных плазмид N15 *E. coli* и p16 *B. burgdorferi*.

Стрелками указаны концевые инвертированные повторы; прямоугольниками выделены одинаковые последовательности; строчными буквами обозначены различающиеся в повторах нуклеотиды



Рис. 3.17. Генетическая карта линейной плазмиды N15

Плазмида N15, хозяином которой служат клетки *E. coli*, уникальна для бактерий кишечной группы. Ее стабильное поддержание обеспечивается стандартными для низкокопийных плазмид локусами *rep* и *par* (рис. 3.17). Линейность плазмиды зависит от гена *tel* теломеразы, формирующей теломеры *telL* и *telR*. Регуляцию экспрессии плазмидных генов осуществляют локусы *immA* и *immB*, отвечающие за иммунитет лизогенов (см. гл. 4), а также локус *inc*. Он кодирует антисмысловую РНК, обеспечивая функцию несовместимости. Появление плазмиды в клетке сопровождается возникновением у них устойчивости к фагу T1, что определяется геном *cor* (лизогенная конверсия, см. гл. 4).

2-микронная плазмида дрожжей

У эукариот основную долю внехромосомной ДНК составляют ДНК органелл. Плазмиды описаны в основном у низших эукариот — дрожжей, простейших и грибов, а также у некоторых высших растений. Они могут локализоваться в ядре или в митохондриях.

Лучше всего изучена 2-микронная плазмида дрожжей *S. cerevisiae* (ее длина 2 мкм, отсюда и название).

Плазмида найдена во многих штаммах дрожжей. Она представляет собой кольцевую молекулу ДНК (6318 п.н.), локализуется в ядре клетки и составляет около 3 % всей дрожжевой ДНК (около 80 копий на гаплоидный геном). Молекула 2-микронной ДНК содержит два идентичных инвертированных повтора IR1 и IR2, включающих по 599 п.н. (рис. 3.18). Между инвертированными повторами в сайте *FRT*, состоящем из трех 13-членных повторов, *in vivo* происходит внутримолекулярная сайт-специфическая рекомбинация, детерминируемая геном *FLP*. Благодаря рекомбинации 2-микронная ДНК существует в двух формах (А и В) в соотношении 1:1.

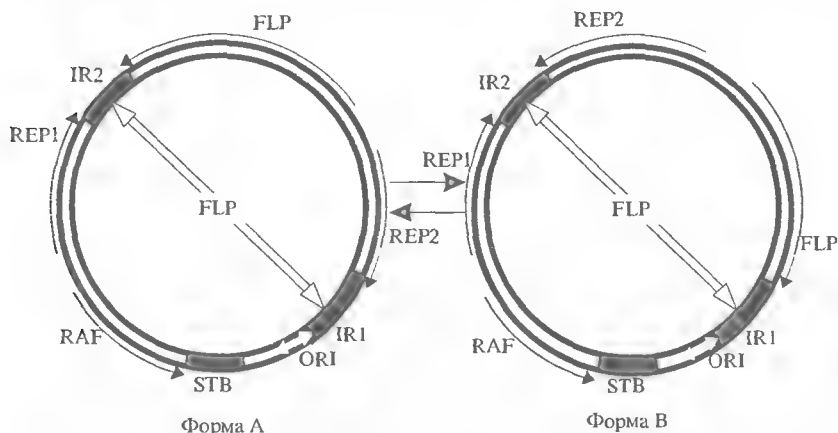


Рис. 3.18. Строение 2-микронной ДНК дрожжей (формы А и В). Тонкие стрелки — локализация и направление транскрипции генов; стрелки по диаметру — участки сайт-специфической рекомбинации; стрелки в *ori*-сайте — направление репликации

В первом повторе находится ее *ori*-сайт, с которого инициируется двунаправленная репликация. Его присутствия достаточно для автономной репликации плазмид, так как структурно он сходен с хромосомными *ori*-сайтами (*ARS*, см. гл. 5) и репликация плазмиды полностью обеспечивается клеточными ферментами. Однако в таком случае число копий невелико. Повышению ко-

пийности 2-микронной ДНК содействует FLP-рекомбинация, так как акт рекомбинации сразу после прохождения репликационной вилки через ближайший к *ori*-сайту повтор меняет способ репликации с тета-формы на катящееся кольцо, преодолевая тем самым характерный для эукариот запрет на повторную инициацию репликации с *ori*-сайта на время, пока не произошло деление клетки.

Ключевую роль в стабильности плазмиды играют гены *REP1* и *REP2*, продукты которых в виде гетеродимера связываются с 9-членными повторами. Эти повторы в разных количествах имеются в сайте *STB*, в промоторных областях генов *REP1* и *FLP*, в повторах *IR1* и *IR2*. Через сайт *STB* обеспечивается распределение плазмидных ДНК по дочерним клеткам. Связывание гетеродимера с другими наномерами необходимо для регулирования числа копий плазмиды. Оно происходит путем подавления транскрипции генов *REP1* и *FLP*, а также путем физического препятствия FLP-рекомбинации через посадку на инвертированные повторы. Сайт *STB* со связанным на нем гетеродимером играет роль сайленсера по отношению к гену *RAF*, продукт которого в норме способствует экспрессии гена *FLP*, и подавляет его транскрипцию. Баланс кинетик всех этих реакций приводит к поддержанию в клетке заданного числа копий плазмиды.

Природная генная инженерия плазмид

Плазмиды в мире микроорганизмов играют роль своеобразных посредников (векторов) при межклеточном обмене генами. Многие из таких генов, в частности, гены устойчивости к антибиотикам, попадают в плазмиды с помощью транспозонов и интегронов (см. гл. 2). Этот процесс способствует быстрой адаптации клеток к изменяющимся факторам среды. Частота таких явлений в природе сравнительно невысока. Однако в последние десятилетия она возросла в результате чрезмерного использования в медицине антибактериальных препаратов и загрязнения окружающей среды промышленными отходами. В клиниках вместо естественных чувствительных штаммов стали выделять их варианты, устойчивые к применяемым лекарственным веществам, а в местах скопления промышленных отходов и ядов были выявлены микроорганизмы, нашедшие здесь для себя экологическую нишу.

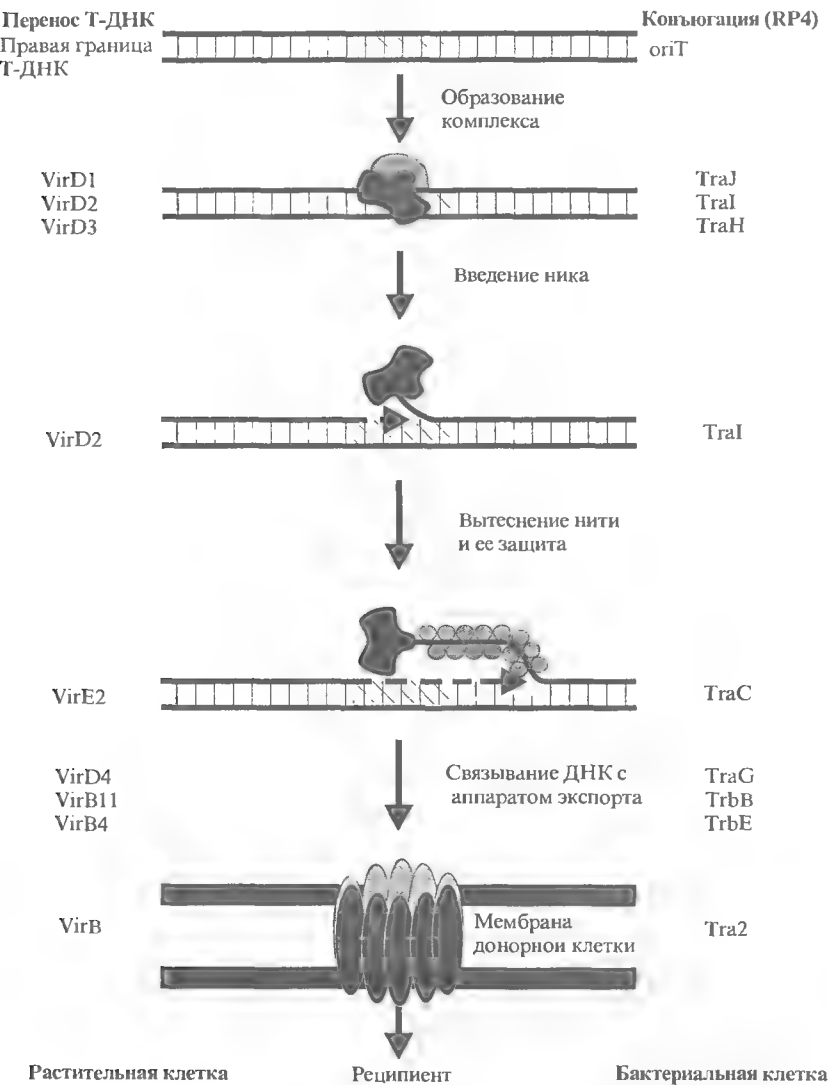


Рис. 3.19. Сравнение схем переноса генов в растительные и бактериальные клетки *vir*- и *tra*-системами (по Lessl, Lanka, 1994)

Способность плазмид переносить гены обеспечивается механизмом конъюгации. По-видимому, он возник на ранних этапах эволюции бактерий, поэтому сходен у разных видов клеток по своему устройству, а гены и белки, участвующие в этом процессе, зачастую высоко гомологичны. У *Bordetella pertussis* этот механизм приспособлен даже для экспорта токсина (Weiss *et al.*, 1993). Возможно, это является причиной универсальности Mpf-функции *tra*-оперонов, способной устанавливать конъюгационный контакт между клетками, относящимися к отдаленным родам и семействам, и даже царствам. Например, переносу генов между клетками *E. coli* и дрожжей *S. cerevisiae* способствуют не только плаزمида RP4, имеющая широкий круг хозяев, но и F-плазмида. Более того, обе плазмиды содействуют мобилизации плазмиды ColE1 (Heinemann, Sprague, 1989). Вопрос только в том, каким образом перенесенные плазмиды можно сохранить в реципиенте.

Эволюционное родство механизмов конъюгации наиболее отчетливо видно при сравнении двух систем переноса генов — *tra* у плазмиды RP4 и *vir* у Ti-плазмиды (рис. 3.19). Одинаковы не только этапы переноса, но и гомологичны многие белки, участвующие в этом: VirD2 и TraI, VirD4 и TraG и др. (см. обзор Lessl, Lanka, 1994). В *oriT*-сайте и в концевых повторах T-ДНК имеется также консервативная последовательность из 12 п.н. в районе, где вводится ник. Об эволюционной близости *tra*- и *vir*-механизмов свидетельствует и тот факт, что межклеточный канал, образованный *vir*-системой, может использовать плазмидная *mob*-система. В частности, *mob*-система плазмиды RSF1010 успешно использована вместо T-ДНК для переноса генов из бактерий *A. tumefaciens* в клетки табака (Buchanan-Wollaston *et al.*, 1987). Еще более впечатляющим примером природной генной инженерии служит сам факт переноса генов Ti-плазмидами из бактерий в растительные клетки и экспрессии плазмидных генов в растениях.

Отметим также роль плазмид в смене белков внешней мембраны клеток, что приводит к их антигенной вариации и способствует повышению устойчивости бактерий против иммунной системы животных. Такую функцию у спирохет *Borrelia* выполняют их линейные плазмиды. Оказалось, что различие в серотипах этих бактерий вызвано разницей в строении белков Vmp,

которые кодируются этими плазмидами (см. обзор Barbour, 1990). Гены *utr* в разных плазмидах либо транскрибируются, либо находятся в неактивном состоянии из-за отсутствия промотора. Неясным пока рекомбинационным механизмом неактивный ген может заместить активно работающий, что и приводит к смене поверхностного белка.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОВТОРЕНИЯ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Вошедшая в клетку несовместимая плаزمида имеет меньше шансов вытеснить резидентную, чем быть самой вытесненной. Почему?

3.2. Белок RepE плазмиды F способен к авторегуляции собственного синтеза. Каким образом?

3.3. Отмечено позитивное влияние *tra*-оперона на стабильность плазмиды: популяция клеток, у которых плазмида содержит дефектный *tra*-оперон, содержит заметно большую долю бесплазмидных бактерий. Как это можно объяснить?

3.4. Опины являются индукторами *tra*-оперона Ti-плазмид, способствуя тем самым переносу плазмид в бесплазмидные клетки. Какой в этом биологический смысл?

3.5. Как осуществляется контроль числа копий у плазмид? Можно ли, не мутируя плазмиды, менять число их копий?

3.6. Назовите основные механизмы, обеспечивающие стабильность плазмид.

3.7. Предложите механизм репликации линейных плазмид, у которых обе нити на концах ДНК ковалентно замкнуты.

3.8. В чем заключается роль FLP-рекомбинации у 2-микронной плазмиды дрожжей?

3.9. Что указывает на эволюционное родство механизма конъюгации с механизмом переноса генов Ti-плазмидами в растения?

3.10. В чем заключается биологическая роль плазмид?

Глава 4

ФАГИ

Перенос клеточных генов с помощью вирусов широко распространен в природе. Об этом уже упоминалось при описании фага-транспозона *Mu* и ретровирусов (см. гл. 2). Явление было впервые обнаружено у фагов (Zinder, Lederberg, 1952) и получило название трансдукции. Различают общую (генерализованную) и специфическую трансдукции. При общей трансдукции в своей головке фаг несет произвольный фрагмент бактериальной ДНК. После инфицирования клеток таким фагом вошедший фрагмент может встроиться в бактериальную ДНК и проявиться фенотипически.

При специфической трансдукции фрагмент бактериальной ДНК связан ковалентно с фаговой хромосомой и реплицируется в ее составе. Это позволяет мультиплицировать трансдуцируемые бактериальные гены и манипулировать ими в лабораторных условиях. Явление специфической трансдукции было открыто при работе с умеренным бактериофагом λ , развивающимся в клетках *E. coli* K-12 (Morse *et al.*, 1956). Этот фаг является представителем большого семейства лямбдоидных фагов. Он сыграл исключительную роль в развитии молекулярной генетики и генетической инженерии. Столь же значительна роль нитевидных фагов семейства M13. Их ДНК широко используется в качестве векторов. Поэтому для понимания многих аспектов генно-инженерных работ необходимо знать основные элементы их генетики и биологии развития. По трем причинам более детально описан фаг λ . Во-первых, это классический объект, послуживший моделью при изучении регуляции экспрессии генов вообще и временного программирования развития фагов в частности. Во-вторых, в 60-е годы он явился объектом, на котором была заложена база генетической инженерии — представление о векторе и возможности клонирования и экспрессии в нем чужеродных генов. В третьих, в 70-е годы

генная инженерия *in vivo*, основанная на его использовании и предназначенная для анализа генома *E. coli*, успешно конкурировала с методами *in vitro*.

ФАГ λ

Генетика. Описанию фага λ посвящено две монографии (Фаг лямбда, 1975; Lambda II, 1983). Его двунитевая линейная ДНК состоит из 48514 п.н. и содержит около 60 генов (рис. 4.1, а; табл. 4.1). На ее концах имеются односторонние комплементарные участки, состоящие из 12 нуклеотидных остатков (*cos*-сайты). Они обеспечивают превращение линейной молекулы ДНК в кольцевую. Такие концы молекул получили название липких.

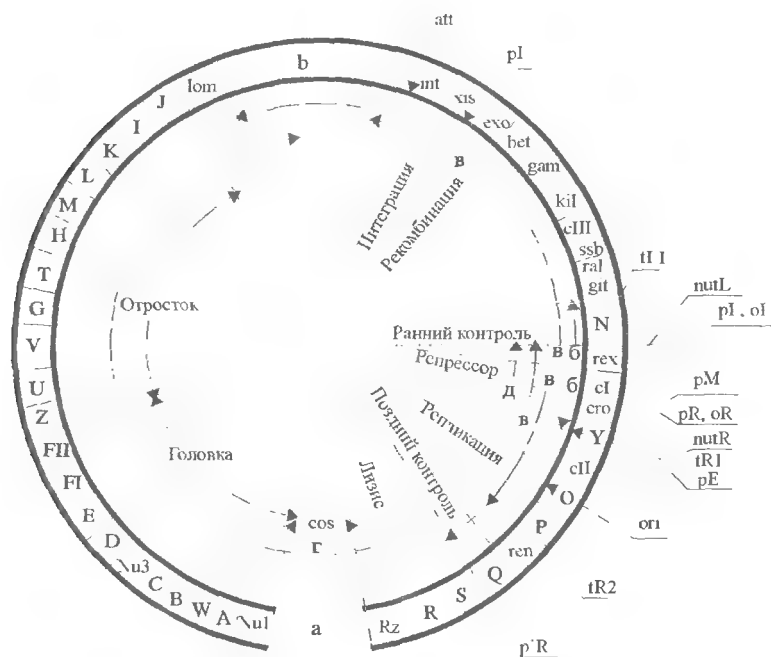


Рис. 4.1. Генетическая карта фага λ и кинетика транскрипции его генов: а — генетическая карта; б — предранние мРНК; в — ранние мРНК; г — поздняя мРНК; д — мРНК, синтезируемая профагом.

Однонаправленные стрелки обозначают мРНК, двунаправленные — функцию. Расшифровка названий генов и сайтов дана в табл. 4.1

Таблица 4.1

Роль основных генов и сайтов фага λ

Гены и сайты	Функции белков или назначение сайтов
<i>Гены</i>	
<i>Nu1, A, W, B, C, Nu3, D, E, F1, F11</i> <i>Z, U, V, G, T, H, M, L, K, I, J</i>	Образование головки
Область b (8 генов)	Образование отростка
<i>int</i>	Несущественна для вегетативного развития фага
<i>xis</i>	Интеграция и исключение λ ДНК из бактериальной хромосомы
<i>exo</i>	Исключение λ ДНК из бактериальной хромосомы
<i>bet</i>	Участие в гомологической рекомбинации
<i>gam</i>	Участие в гомологической рекомбинации
<i>kil</i>	Ингибирование бактериальной экзонуклеазы V
<i>cII, cIII</i>	Инактивация клеток
<i>N</i>	Позитивная регуляция генов <i>cI</i> и <i>int</i>
<i>rexAB</i>	Позитивная регуляция ранних функций путем антитерминации лево- и правосторонней транскрипции в сайтах tL1, tR1, tR2
<i>cI</i>	Исключение развития других фагов
<i>cro</i>	Репрессия всех фаговых функций через операторы oL и oR
<i>O</i>	Частичное подавление транскрипции через операторы oL и oR
<i>P</i>	Инициация репликации λ ДНК. Узнавание <i>ori</i> -сайта и связь с белком grP
<i>Q</i>	Инициация репликации λ ДНК. Связь с фаговым белком grO и бактериальным белком DnaB
<i>S</i>	Позитивная регуляция генов <i>S—J</i> путем антитерминации транскрипции в сайте t'R
<i>R</i>	Регуляция лизиса клетки через взаимодействие с цитоплазматической мембраной
<i>Rz</i>	Лизис клеток (эндолизин трансгликозилазного действия)
<i>Rz</i>	Лизис клеток (эндолизин эндопептидазного действия)

Гены и сайты	Функции белков или назначение сайтов
<i>Сайты</i>	
<i>att</i>	Интеграция λ ДНК в бактериальную хромосому
<i>pI</i>	Промотор транскрипции гена <i>int</i> , зависящей от белка CII
<i>pL, pR</i>	Промоторы левосторонней (L) и правосторонней (R) транскрипции генов
<i>pM</i>	Промотор транскрипции гена <i>cI</i> в лизогенном состоянии
<i>pE</i>	Промотор транскрипции гена <i>cI</i> при установлении лизогенного состояния (зависит от белка CII)
<i>p'R</i>	Промотор правосторонней транскрипции генов <i>S—J</i>
<i>oL, oR</i>	Операторы, связывающие белки-репрессоры CI и Cro
<i>tL1, tR1, tR2</i>	Терминаторы лево- (L) и правосторонней (R) транскрипции
<i>t'R</i>	Терминатор транскрипции, инициированной с промотора <i>p'R</i>
<i>nutL, nutR</i>	Связывание продукта гена <i>N</i> с РНК-полимеразой
<i>y</i>	Регуляторная область, содержащая сайты <i>nutR</i> , <i>tR1</i> и <i>pE</i>
<i>ori</i>	Начало двусторонней репликации λ ДНК
<i>cos</i>	Однонитевые комплементарные концы линейной λ ДНК, необходимые для ее циркуляризации

Развитие фага λ осуществляется в три этапа и начинается с предраннего периода, который охватывает время от появления его ДНК в цитоплазме до синтеза первых фаговых продуктов. В предраннем периоде развития принимают участие только бактериальные ферменты: ДНК-лигаза (превращает линейную молекулу λ ДНК в кольцевую) и РНК-полимераза (осуществляет считывание регуляторных генов *N* и *cro* с промоторов *pL* и *pR*). Образовавшиеся в этот период цепи мРНК обрываются в терминирующих сайтах *tL1* и *tR1* (рис. 4.1, б) благодаря действию клеточного фактора терминации Rho.

Ранний период развития фага начинается после синтеза в клетке N-белка, который связывается с РНК-полимеразой в сайтах *nutL* и *nutR* (*nut* — N utilisation), помогая ей преодолевать терминаторы транскрипции. В результате транскрипция, иници-

рованная в предранний период и прерванная в этих сайтах, продолжается, обеспечивая образование продуктов правого и левого ранних оперонов (рис. 4.1,е). Правый содержит репликационные гены *O* и *P*, а левый — рекомбинационные гены *red* (*exo* и *bet*).

Наиболее ответственным моментом раннего периода является репликация фаговой ДНК. Для ее инициации нужна транскрипция *ori*-сайта с промотора *pL* и наличие фаговых белков *gpO* и *gpP* (*gp* — gene product). Продукт гена *O* бифункционален: одной частью он “узнает” *ori*-сайт, располагающийся в самом гене, а другой — взаимодействует с *P*-продуктом, который в свою очередь через белок *DnaB* связывается с репликационным комплексом. Анализ образовавшихся *in vivo* репликативных интермедиатов свидетельствует о том, что а) на суперскрученной молекуле λ ДНК с *ori*-сайта может инициироваться и двусторонняя, и односторонняя (25 % молекул) репликация и что б) уже с первых минут инфекции репликация идет и в тета-, и в сигма-форме. Предполагается, что у молекул с односторонней направленностью репликации после одного раунда синтеза ДНК 3'-конец синтезированной нити вытесняет ее 5'-конец из интермедиата, что и является переходом на сигма-форму репликации. В этом случае у кольцевой молекулы ДНК появляется линейное ответвление (конкатемер), состоящее из нескольких фаговых геномов, разделенных *cos*-сайтами. Такая структура в поздний период обеспечивает упаковку λ ДНК в головку фага, так как для процесса упаковки обязательно наличие в ДНК как минимум двух *cos*-сайтов.

Развитию фага препятствует бактериальная *RecBCD* экзонуклеаза (экзонуклеаза V), которая активно расщепляет линейные молекулы ДНК, начиная с их концов. Сохранность конкатемера обеспечивает продукт фагового гена *gam*, инактивирующий экзонуклеазу. В случае мутации в этом гене *RecBCD* экзонуклеаза расщепляет конкатемер, и упаковка λ ДНК происходит только с использованием кольцевых мультимеров, образующихся с помощью *Red* и *RecA* функций. В клетках *recBCD*⁻ зависимость развития фага λ от рекомбинационных функций пропадает. Из-за пониженной “урожайности” фаги λ *red*⁻ *gam*⁻ формируют лишь маленькие негативные колонии на газоне *recA*⁺ клеток. Нормальное развитие этих фагов восстанавливается, если в их геном ввести *chi*-сайт, который является “горячей” точкой *RecA*-зависимой рекомбинации. Развитию фага λ *red*⁺ препятствует также присутствие в клетках экзонуклеазы *Old* фага P2

(Spi^+ -фенотип), но фаги λ_{red} титруются на лизогенах с профагом P2 (Spi^- -фенотип). Причина этого эффекта не выяснена.

Ранний период развития фага завершается либо появлением в цитоплазме Q-продукта, контролирующего транскрипцию поздних генов, либо интеграцией профага в бактериальную хромосому.

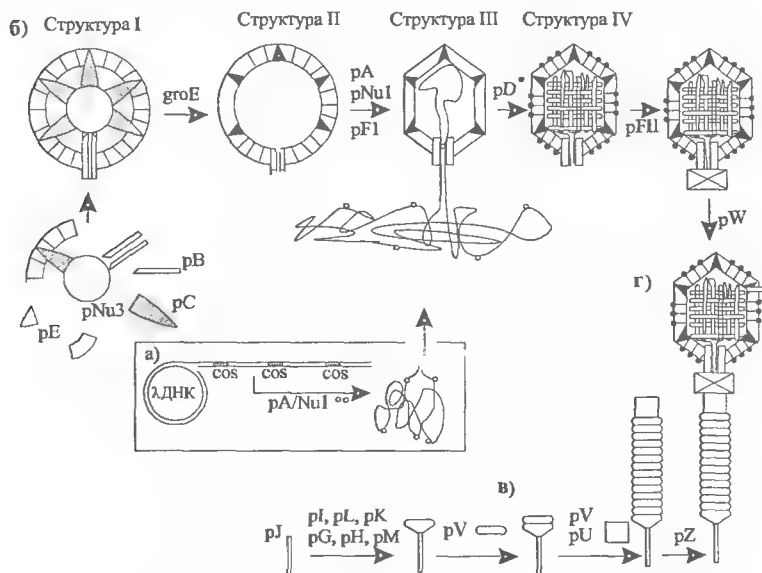


Рис. 4.2. Морфогенез фага λ : а — репликация ДНК в сигма-форме; б — этапы сборки головки; в — этапы сборки отростка; г — зрелый фаг

Заключительный поздний период развития фага начинается с транскрипции поздних генов $S-R_z$ и $NuI-J$ с промотора p^R (рис. 4.1,2). Гены $NuI-FII$ содержат информацию о синтезе белков головки и ее сборке, а гены $Z-J$ обеспечивают образование отростка фага. Сборка головки фага протекает поэтапно (рис. 4.2). Сначала вокруг центрального ядра, состоящего из белков gpNu3, gpB и gpC, собирается сфера из основного белка головки gpE (структура I). Далее центральное ядро удаляется с помощью бактериального продукта GroE, и в образовавшуюся структуру II начинается упаковка λ ДНК. На этом этапе белок gpF способствует расширению головки фага (структура III), а белки gpNu1 и gpA “вырезают” фаго-

вые геномы по *cos*-сайтам из конкатемерной λ ДНК. Головка, содержащая ДНК, фиксируется белком gpD (структура IV), и к ней с помощью белков gpW и gpFII присоединяется отросток (его морфогенез осуществляется независимо). Сформировавшийся фаг выходит в среду после лизиса клетки, осуществляемого продуктами генов *S*, *R* и *Rz*.

Вопрос о путях развития фага (литический или лизогенный) решается в раннем периоде. Установление лизогенного состояния в клетках определяется двумя независимыми процессами: подавлением транскрипции ранних оперонов, которое осуществляется репрессором — продуктом гена *cI* через операторы *oL* и *oR* (они перекрываются с промоторами *pL* и *pR*), и интеграцией фаговой ДНК в бактериальную хромосому с помощью фагового белка *Int* и бактериального белка *HimA*. Оба процесса регулируются продуктами генов *cII* и *cIII*, способствующими увеличению концентрации белков *CI* и *Int* путем включения транскрипции генов *cI* и *int* с промоторов соответственно *pE* и *pI*.

Продукт гена *cro*, определяющий литический путь развития фага λ , является его вторым репрессорным белком, действующим на те же операторы, что и репрессор *CI*. В процессе конкуренции с последним *Cro*-белок снижает через операторы *oL* и *oR* уровень синтеза ранних белков, что необходимо для максимальной экспрессии поздних функций фага, и выключает транскрипцию гена *cI*. Таким образом, установление лизогенного состояния в клетках обуславливается левосторонней транскрипцией с промоторов *pL*, *pI* и *pE*, а литическое развитие фага — правосторонней транскрипцией с промоторов *pR* и *p'R*. В итоге “судьба” фага определяется соотношением концентраций продуктов *CI/CIII* и *Cro*, которое в свою очередь зависит от физиологического состояния клетки в момент ее инфицирования.

Лизогенное состояние закрепляется транскрипцией гена *cI* с промотора *pM*. Синтезируемый белок-репрессор *CI* связывается с операторами *oL* и *oR* и полностью блокирует транскрипцию ранних генов (см. рис. 4.1, д), подавляя вегетативное развитие фага. При инактивации репрессора в лизогенных клетках индуцируется развитие профага по описанным ранее трем этапам, причем до появления в раннем периоде белков *Int* и *Xis* транскрипция и первый раунд репликации профага происходят в составе бактериальной хромосомы.

Индукцию λ -лизогенов осуществляют облучением культуры легкой дозой УФ-света. Этот метод основан на природном свойстве многих профагов приступить к литическому развитию, если клетка оказы-

вается в условиях, неблагоприятных для ее существования. При действии УФ-света в клетках активируется RecA-белок, который способствует автопротеолизу репрессоров, контролирующих систему репарации ДНК. Репрессор C1 также расщепляется, что приводит к индукции профага λ . В лабораторной практике более удобна термоиндукция (прогревание культуры лизогенных клеток при 42°C), которая возможна при наличии в гене репрессора термочувствительной мутации (обычно c1857). Если профаг переносится каким-либо механизмом (конъюгация, трансфекция, трансдукция фагом P1) в нелизогенную клетку, то из-за отсутствия белка-репрессора в ней начинается развитие фага. Это явление получило название зиготной индукции. Оно присуще большинству умеренных фагов, даже неиндуцибельных.

Механизм лизогении. Согласно Кэмпбеллу (Campbell, 1962), интеграция λ ДНК в бактериальную ДНК происходит через специфические *att*-сайты с помощью фагового продукта *Int* и продукта бактериального гена *himA* (рис. 4.3а,б,в). Фаговый и бактериальный сайты устроены сходным образом. Их основу составляют одинаковые последовательности (O) из 15 п.н., фланкированные участками определенного строения. Эти участки у фагов обозначаются Р и Р', у бактерий — В и В', так что строение *att*-сайтов выражается: $\text{attP} = \text{ROP}'$ и $\text{attB} = \text{BOB}'$. Участки Р и Р' состоят соответственно из 145 и 75, а В и В' — из 3—5 п.н. Белок *Int*, будучи топоизомеразой типа I, осуществляет в центральных участках O фагового и бактериального *att*-сайтов поочередное разрезание нитей ДНК. В результате образуются ступенчатые двунитевые разрывы, имеющие однонитевые комплементарные участки из 7 нуклеотидов. При взаимном обмене такими концами между сайтами ROP' и BOB' фаговая ДНК встраивается в бактериальную хромосому, причем на концах профага оказываются рекомбинантные *att*-сайты BOR' и ROB' . В случае индукции своего развития профаг исключается через эти сайты из бактериальной хромосомы с помощью белков *Int* и *Xis*.

Иногда, с частотой около 10^{-6} , исключение профага осуществляется по случайным сайтам с захватом бактериальных генов, располагающихся слева или справа от него. Эти гены локализуются в фаговой ДНК соответственно слева или справа от *att*-сайта (рис. 4.3,г). Образующиеся в результате фаги называют трансдуцирующими.

Для образования трансдуцирующих фагов с определенными бактериальными генами необходимы два условия — близость рас-

положения данного гена к месту посадки профага (чем ближе, тем с большей вероятностью он включается в трансдуцирующий фаг) и сохранение в геноме трансдуцирующего фага *cos*-сайта (необходим для упаковки λ ДНК в фаговую головку). Молекулы ДНК, длина которых превышает длину λ ДНК более чем на 5–6 %, не упаковываются в головку. Поэтому включение бактериальных генов в фаговый геном обычно происходит при потере части фаговой ДНК, что вызывает дефектность трансдуцирующих фагов.

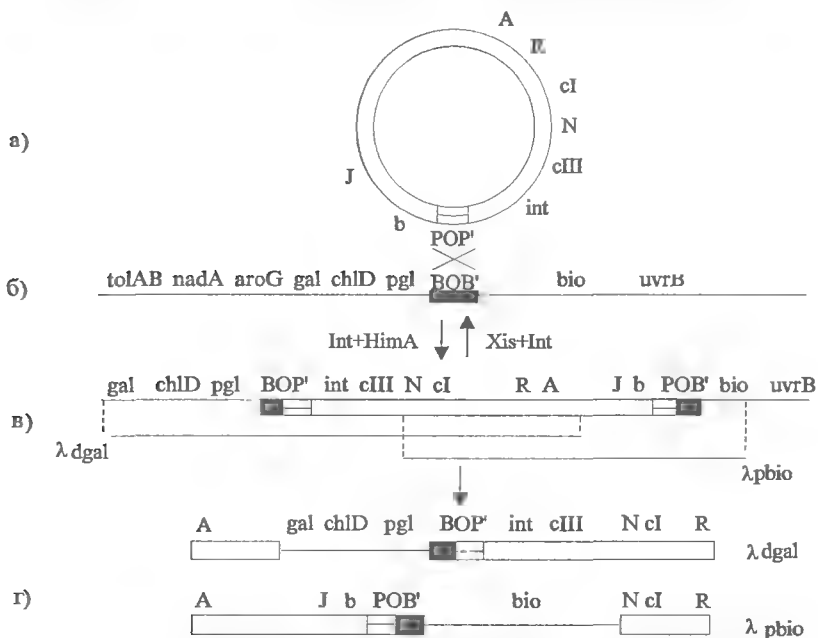


Рис. 4.3. Схема интеграции ДНК фага λ в бактериальную хромосому и механизм образования трансдуцирующих фагов: а — кольцевая λ ДНК; б — участок бактериальной хромосомы около сайта интеграции профага *BOV'*; в — профаг с прилегающими бактериальными генами и способы его неправильного исключения; г — трансдуцирующие фаги, дефектный (λ dgal) и жизнеспособный (λ pbio)

Почти все гены фага λ , несущественные для его вегетативного развития, группируются вместе по обе стороны от *att*-сайта в областях *b* и *int-cIII*. По этой причине они располагаются на обоих

концах профага. Замена этих генов на чужеродную ДНК приводит к образованию жизнеспособных трансдуцирующих фагов. Так можно получить, например, жизнеспособные трансдуцирующие фаги типа λ *rchID* (*r* обозначает жизнеспособность), включающие не более 10 т.п.н. бактериальной ДНК, и типа λ *rbio*, где чужеродный фрагмент ДНК не превышает 8 т.п.н. В дефектные трансдуцирующие фаги типа λ *dgal* (*d* обозначает дефектность) вместо всех генов левой части фагового генома включается до 25 т.п.н. чужеродной ДНК. С другого конца профага гены *int-cl* можно заменить фрагментом бактериальной ДНК длиной до 12 т.п.н. (При этом образуется трансдуцирующий фаг λ *duvrB*.) Уменьшение длины заменяемой ДНК в фаге λ *duvrB* по сравнению с таковой в фаге λ *dgal* объясняется необходимостью сохранения промотора *pR* и генов *O* и *P*, осуществляющих автономную репликацию фаговой ДНК.

Получение необычных трансдуцирующих фагов. Из приведенных данных о размерах фрагментов ДНК, которые могут быть включены в фаговый геном, следует, что фаг λ может трансдуцировать гены, удаленные от *attB*-сайта не более чем на 10—20 т.п.н. Чтобы расширить спектр трансдуцирующих фагов, были разработаны методы сближения бактериальных *att*-сайтов с выделяемыми генами.

Наиболее простым является метод делеций, заключающийся в удалении части ДНК между *att*-сайтом и искомым геном. Например, оперон *tolAB* находится на расстоянии приблизительно 25 т.п.н. от *attB*-сайта (см. рис. 4.3,б), и поэтому не может включиться в трансдуцирующий фаг. Такая возможность появляется после удаления генов *nadA*—*aroG*—*gal*—*chlD* (около 15-т.п.н.), разделяющих оперон *tolAB* и *attB*-сайт, в результате чего можно выделить фаг λ *tolAB*.

Метод делеций используется и для получения жизнеспособных трансдуцирующих фагов вместо дефектных. Обычно из штаммов *E. coli* K-12 выделяют, например, только дефектные λ -частицы, несущие *gal*-оперон. Делетирование генов *chlD*—*pgl* позволяет изолировать жизнеспособный фаг λ *rgal*, у которого *gal*-оперон замещает область *b*.

В 1964 году Кюзэн и Жакоб предложили метод переноса генов в разные участки бактериальной хромосомы с помощью плазмид. Они использовали для этой цели плазмиду F'_{cs}-*lac*. Термочувствительность ее репликации являлась

селективным признаком для отбора клеток с интегрированными плазмидами. Беквис и Сигнер в 1966 году применили этот метод для интеграции плазмиды $F'_{ts}-lac$ по обе стороны от профага $\phi 80$ (представитель семейства лямбдоидных фагов) и из соответствующих штаммов выделили трансдуцирующие фаги $\phi 80dlac$ типов λgal и λbio . Так впервые было осуществлено включение в трансдуцирующий фаг гена, располагающегося далеко от профага.

При наличии рядом с профагом гена, инактивация которого приводит к появлению селективного признака, возникает возможность прямого отбора клеток с нужной локализацией интегрированных плазмид. Исключительно удобным для этой цели оказался находящийся рядом с профагом $\phi 80$ локус *tonB*, поскольку из-за его инактивации, вызванной интеграцией в него плазмиды, клетки приобретают устойчивость к фагам T1 и $\phi 80$, а также к колицину В. Инактивированный ген *galE* тоже является селективным маркером, позволяющим отбирать бактериальные штаммы, плазмиды у которых интегрировались рядом с сайтом *attL*. После интеграции плазмиды $F'_{ts}-lac$ в *gal*-оперон и приближения гена *lac* к λ -профагу методом делеций был выделен широко известный фаг $\lambda plac5$, с помощью которого впервые методом *in vitro* удалось изолировать ген *lac* (Shapiro *et al.*, 1969).

Метод слияния плазмид основывается на сближении бактериального *att*-сайта с выделяемым геном путем рекомбинации плазмид, несущих эти локусы. Отбор рекомбинантных молекул базируется на свойстве несовместимости родственных плазмид. Например, после конъюгации клеток *E. coli* K-12 *recAmetBargG/F'metB⁺argE⁺* и *recAtrp/F'trp⁺att ϕ 80* на среде без метионина, аргинина и триптофана развиваются только клетки с рекомбинантной плазмидой *F'metB⁺argE⁺trp⁺att ϕ 80*. Мутации *recA* предотвращают рекомбинацию плазмид по областям гомологии. Поэтому плазмиды объединяются через IS-элементы. Это позволило сблизить сайт *att ϕ 80* с генами *metB* и *argE* настолько, что после посадки профага $\phi 80$ в данный сайт удалось выделить фаги $\phi 80dmetB^{+}$ и $\phi 80dargE^{+}$.

Чаще всего новые варианты трансдуцирующих фагов получают с помощью необычных посадок профага (метод Шимадзу). Для эффективной интеграции профага λ нужна полная гомология участков O фагового и бактериального *att*-сайтов. Профаг может интегрироваться с различной частотой и в другие участки

бактериальной хромосомы, называемые вторичными *att*-сайтами. Это легко обнаруживается при делетировании основного *attB*-сайта. Есть определенная корреляция между степенью гомологии участков О вторичных *att*-сайтов и эффективностью интеграции в них профага.

Необычная интеграция профага внутри гена приводит к инактивации последнего. Однако и в этом случае можно выделить фаг, несущий неповрежденный ген. Например, из штамма, в котором профаг λ интегрирован в ген *trpC*, выделены фаги $\lambda trpABC'$ и $\lambda trp'CDE$. Их рекомбинация между собой по *att*-сайтам с помощью *Int*-системы позволила восстановить целостность *trp*-оперона и получить трансдуцирующий фаг $\lambda trpABCDE$ (рис. 4.4).

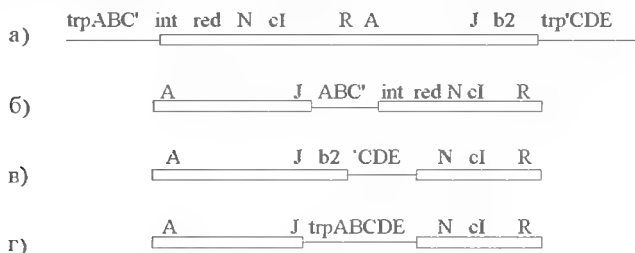


Рис. 4.4. Способ восстановления исходной структуры гена в трансдуцирующих фагах, полученных методом Шимады: *а* — генетическая карта профага λ , находящегося в гене С триптофанового оперона; *б* и *в* — карты трансдуцирующих фагов $\lambda trpABC'$ и $\lambda trp'CDE$; *г* — карта трансдуцирующего фага $\lambda trpABCDE$, полученного в результате рекомбинации фагов $\lambda trpABC'$ и $\lambda trp'CDE$ по гибридным сайтам *att*

Если в геномах умеренного фага и бактерии имеются гомологичные последовательности нуклеотидов, возможна интеграция профага через области гомологии с помощью *RecA*-зависимой рекомбинации и последующая трансдукция близких к профагу генов. Этот способ получения трансдуцирующих фагов был впервые применен при лизогенизации клеток фагом $\phi 80dmerB$, причем профаг внедрился в ген *metB*. Из данного штамма удалось выделить фаги $\phi 80dpoB$ и $\phi 80dglyT$, поскольку гены *rpoB* и *glyT* локализуются на бактериальной хромосоме рядом с геном *metB*.

Этот метод особенно удобен при использовании транспозонов, локализованных на фаговой ДНК. Если нужно провести направленную интеграцию профага, то рядом с соответствующим бактериальным геном внедряют гомологичный транспозон. Так была осуществлена посадка профага $\lambda::IS2$ рядом с опероном *gal* (рис. 4.5, *a*), для чего была сконструирована пара фагов λ рМу', каждый из которых несет один из концов Му ДНК. ДНК этих фагов интегрируются в разные концы профага Му, который встраивают вблизи нужного гена. При этом один из профагов λ рМу' оказывается рядом с данным геном и в случае индукции профага извлекает его из бактериальной хромосомы. Создана коллекция из более чем 200 штаммов *E. coli* с различными посадками транспозона Tn10 и его производного Tn10kan (Singer *et al.*, 1989). Благодаря селективным генам Tc^R и Km^R и областям гомологии она позволяет маркировать и выделить большинство бактериальных локусов.

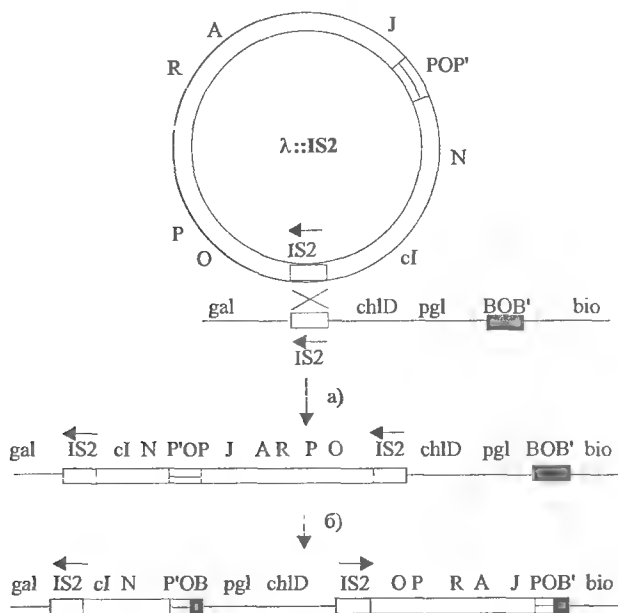


Рис. 4.5. Схема интеграции профага $\lambda::IS2$ в бактериальную хромосому через IS2-элемент (*a*) и инверсии участка ДНК в результате рекомбинации между *att*-сайтами P'OP и BOB' (*б*)

Рассмотренные методы сближения генов с профагами используются также для выделения трансдуцирующих фагов, несущих гены других видов бактерий, перенесенных в клетки *E. coli*. Например, перенос плазмиды *F'**his* из клеток *S. typhimurium* в клетки *E. coli* и ее интеграция в локус *tonB* позволили выделить фаг $\phi 80dhis$, несущий гистидиновый оперон клеток сальмонеллы. Другой пример. Клетки *E. coli* не могут использовать гистидин в качестве источника углерода, а клетки *S. typhimurium* могут, поскольку имеют опероны *hut*, локализующиеся между генами *gal* и *bio*. Оказалось, что в клетках *S. typhimurium* в данной области располагается собственный сайт *attL*. Поэтому конъюгационный перенос области *gal-bio* из клеток *S. typhimurium* в клетки *E. coli* и лизогенизация гибридных клеток фагом λ дали возможность выделить фаг $\lambda phut$.

С помощью описанных методов выделено более 100 трансдуцирующих фагов λ и $\phi 80$, несущих различные бактериальные гены. Такие фаги являются продуцентами соответствующих продуктов, если трансдуцируемый ген сохранил собственный промотор или стал членом фагового оперона. Выход продуктов можно увеличивать, используя фаговые мутации, которые отсрочивают время лизиса (*S'*), блокируют все (*N'*) или только поздние (*Q'*) функции. Например, при развитии фага λ *Q'* *ptrpE* антранилатсинтетаза составляла более 25 % всего растворимого клеточного белка (Moir, Brammar, 1976).

Перенос транспозонов и плазмид. Трансдуцирующие фаги после введения в них транспозонов приобретают способность интегри-

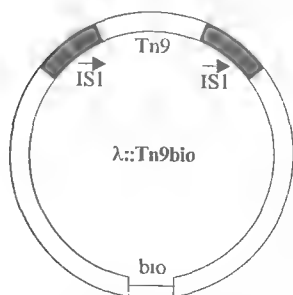


Рис. 4.6. Структура ДНК трансдуцирующего фага $\lambda::Tn9bio$

роваться в бактериальную хромосому и переносить гены с помощью системы транспозиции. В норме трансдуцируемый ген закрепляется в реципиентной клетке благодаря происходящей в ней RecA-зависимой рекомбинации или Int-зависимой интеграции профага. В то же время фаг $\lambda::Tn9bio$ осуществляет перенос гена *bio* в условиях дефектности генов *recA*, *int* и *red*. Это вызвано тем, что кольцевая ДНК данного фага фактически представляет коинтегра

генетических структур, разделенных IS1-элементами (рис. 4.6). После инфицирования клеток фагом λ ::Tn9bio коинтегра́т распадается в результате рекомбинации по IS1-элементам, причем каждая из двух образовавшихся структур может интегрироваться в бактериальную ДНК через свой IS1-элемент. При отсутствии в бактериальном хромосоме гомологичных элементов и в случае делеции *att*-сайта и гена *int* профаги локализуются в случайных местах. Из бактериального штамма, в котором этот профаг внедрился в ген *lacY*, удалось выделить трансдуцирующий фаг λ placZ.

Способность транспозонов образовывать коинтегра́ты используется для трансдукции фагом λ небольших плазмид. В таких случаях для увеличения емкости фогового генома в область *b* вводят делеции. Например, коинтегра́т из двух репликонов λ b519b515 и неконъюгативной плазмиды pMB9::Tn3 упаковывается в фоговую головку. В реципиентных клетках, инфицированных полученным фаголизатом, коинтегра́т распадается, в результате чего появляется свободная плази́да (рис. 4.7).

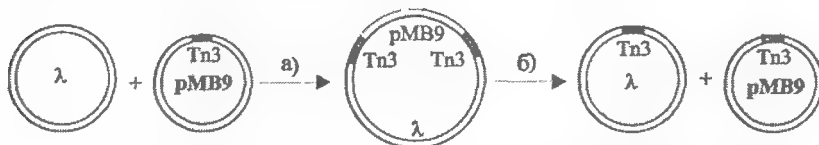


Рис. 4.7. Механизм трансдукции фагом λ неконъюгативной плазмиды pMB9, содержащей транспозон Tn3: *a* — образование коинтегра́та в донорных клетках; *б* — распад коинтегра́та в реципиентных клетках

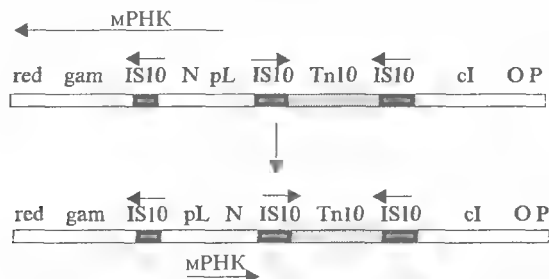


Рис. 4.8. Инверсия регулярного участка фага λ ::Tn10 вследствие рекомбинации между инсерциями IS10. Жирными стрелками обозначены мРНК, тонкими — ориентации IS-элементов

Уже отмечалось, что транспозоны придают отдельным участкам генома мобильные свойства. Подобные свойства были обнаружены у фага λ , имеющего около гена *cI* транспозон Tn10. У этого фага с частотой 10^{-2} инвертирует участок ДНК, несущий промотор *pL* и ген *N* (рис. 4.8). Фаги, содержащие инвертированный участок, обладают фенотипом Red Gam⁻, так как у них нет транскрипции одноименных генов. Эти фаги плохо развиваются в клетках *recA*⁻, но титруются на лизогенах с профагом P2 (Spi⁻-фенотип). Мутантные фаги “ревертируют” в исходную форму также с частотой 10^{-2} . Установлено, что вращение участка с геном *N* зависит от RecA-функции. Поэтому предполагается, что у данного мутантного фага около генов *gam* и *N* есть еще один IS10-элемент и что у данного мутантного фага между ним и концевым IS10-элементом транспозона Tn10 происходит внутримолекулярная гомологическая рекомбинация. Подобный пример генной инженерии *in vivo* можно продемонстрировать и на профаге λ ::IS2, интегрированном в область *gal*—*attB*-сайт через IS2-элементы (см. рис. 4.5). Эти элементы были ориентированы таким образом, что профаг локализовался в направлении, противоположном обычному. Поэтому направление сайтов POP' и BOB' также изменилось на противоположное. В указанных условиях внутримолекулярная сайт-специфическая рекомбинация сайтов POP' и BOB' обусловила инверсию участка ДНК, лежащего между ними, что повлекло за собой разрыв профага (рис. 4.5,б).

Фаги лямбдоидного семейства

Фаги, родственные фагу λ , называют лямбдоидными; они составляют целое семейство. Геномы лямбдоидных фагов имеют сходное строение, практически одинаковый набор и порядок генов, одинаковый механизм лизогении через интеграцию профага в бактериальную хромосому. Родственность фагов определяется по возможности генетической рекомбинации между членами семейства.

Сравнение геномов любых двух лямбдоидных фагов выявляет значительные расхождения в последовательности нуклеотидов в одних сегментах и их практическую идентичность в других. Эта высокая полиморфность ДНК лямбдоидных фагов определяет их биологическую специфичность. Специфичными могут быть отдельные белки (репрессоры *C1*, определяющие иммунитет лизоген-

нов; белки gpO — инициаторы синтеза ДНК; белки — антитерминаторы транскрипции gpN и gpQ; белки терминазы gpA и gpNu1, разрезающие ДНК в *cos*-сайте; белок gpJ, определяющий круг клеток-хозяев; белок Int, осуществляющий интеграцию профага), а также отдельные механизмы (упаковки ДНК, контроля ранних функций, иммунитета, лизиса). Подобную полиморфность можно проиллюстрировать на примере фагов λ , 21, P22 и 434. Профаги λ и 434 интегрируются в идентичные сайты на бактериальной хромосоме и имеют взаимозаменяемые интегразы, но хозяйская специфичность и специфичность к репрессии (иммунитет) у них различна. Фаги 21 и P22 (его хозяином являются клетки *S. typhimurium*) имеют близкую специфичность к репрессии, но разную хозяйскую специфичность и разные сайты интеграции их профагов. В то же время интеграза 21 близка по строению к λ -интегразе, а интеграза P22 нет. По хозяйской специфичности сходны только фаги λ и 21.

Более детальное рассмотрение структуры фаговых генов выявило дополнительную характеристику семейства. Даже внутри высокомонологичных сегментов ДНК встречаются вставки, происходящие из негомнологичных участков других лямбдоидных фагов, а внутри гетерологичных сегментов существуют короткие последовательности, идентичные локусам других фагов. Кажется очевидным, что все члены семейства произошли в процессе эволюции от общего предка, но построить древо эволюционного родства оказалось затруднительным, так как фаги интенсивно рекомбинировали и, по-видимому, продолжают рекомбинировать друг с другом. Поэтому лямбдоидные фаги предлагается рассматривать как отдельные виды, которые приобрели функциональные генетические модули из общего пула генов (Campbell, Botstein, 1983; Campbell, 1984; Campbell, 1988). Этот пул генов составляют сами фаги, их профаги и дефектные профаги лямбдоидного типа (в хромосоме *E. coli* K-12 их обнаружено 4 — DLP12, e14, *gac* и *qin*). Наиболее естественной представляется рекомбинация между инфицирующим фагом и гетероиммунными профагами, активными или дефектными.

Определение семейства лямбдоидных фагов, очевидно, будет изменено в результате установленного факта, что колифаг N15 отнесется фактически к этому же семейству. Профаг этого фага

уникален: он является плазмидой (Ravin, Schulga, 1970), причем ее ДНК линейна и имеет ковалентно замкнутые (шпилечные) концы (Сварчевский, Рыбчин, 1984; см. рис. 3.16,а; 3.17). В классификации способов лизогении этот пример до сих пор является единственным, другие профаги подобного строения пока не описаны.

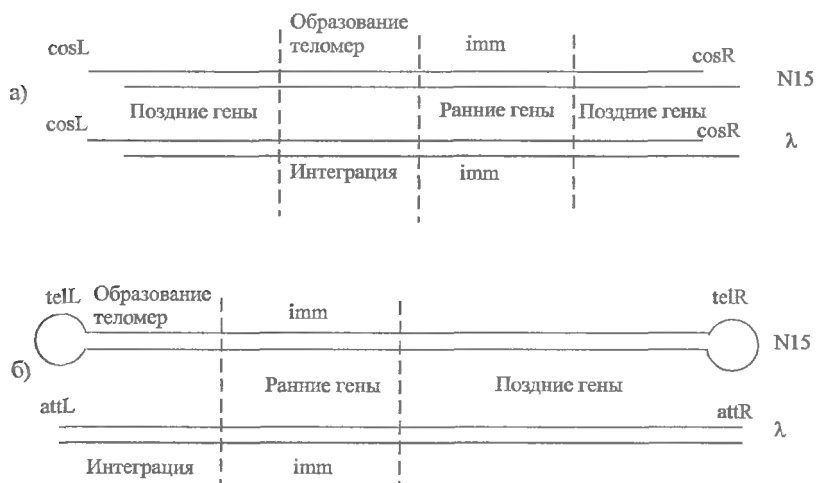


Рис. 4.9. Сравнение геномов фагов (а) и профагов (б) N15 и λ

ДНК фага N15, как и λ ДНК, имеет липкие концы, а физические карты фага и профага пермутированы по кольцу. Геном фага N15, как и у лямбдоидных фагов, устроен по блочному принципу: его ранние и поздние гены кластированы. Фаг N15 и лямбдоидный фаг φ80 близки по характеру лизогенной конверсии и структуре гена *cor*, ответственного за этот феномен, а также по физической гомологии большинства поздних генов этих фагов. В то же время фаг N15 и лямбдоидные фаги существенно различны по механизму лизогении: лямбдоидные профаги интегрируются в бактериальную хромосому по Кэмпбеллу, а профаг N15 находится в плазмидном состоянии. Тем не менее, блок генов, определяющих лизогенное (плазмидное) состояние ДНК фага N15, находится, как и у лямбдоидных фагов, в середине фагового генома (рис. 4.9,а). Сходна и генетическая структура профагов обоих фагов (рис. 4.9,б). Кроме упомянутого выше блока генов геном профага N15 содержит блок ранних генов, ведущих его литическую репликацию и

поддерживающих плазмидное состояние, а также блок поздних генов, кодирующих структурные белки и ферменты, обеспечивающие лизис клетки. Первые два блока уникальны, а третий принадлежит лямбдоидному семейству (см. полная последовательность, GenBank accession number AF064539).

Отметим, что умеренные фаги, профаг которых находится в плазмидном состоянии, называют фазами. Именно к таким объектам относится фаг P15.

Фаг P1

Фаг P1 является самым крупным умеренным фагом *E. coli*, размер его генома около 90 т.п.н. Он также относится к фазмидам, т. е. способен развиваться и литически, и поддерживаться в виде низкокопийной кольцевой плазмиды. В соответствии с таким способом жизни фаг обладает двумя репликаторами — *oriL* для литической репликации и *oriR* для плазмидной репликации (рис. 4.10), но в обоих случаях репликация ведется бактериальной ДНК-полимеразой III (см. обзор Yarmolinsky, Sternberg, 1988).

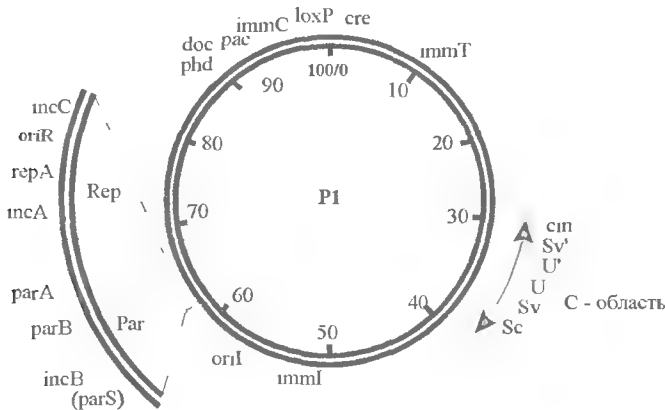


Рис. 4.10. Упрощенная генетическая карта фага P1 (по Yarmolinsky, Lobocka, 1993).

Размер: 1 единица карты равна 0,97 т.п.н.

Длина линейной ДНК, выделяемой из фаговых частиц, превышает размер генома на 10 т.п.н. Из-за особенностей механизма

упаковки фаговой ДНК ее концы гомологичны (см. ниже). Благодаря *RecA*-зависимой рекомбинации по участкам гомологии фаговая ДНК после инфицирования клеток циркуляризуется, а затем регуляторной системой, состоящей из локусов *immC*, *immI* и *immT*, принимается решение о дальнейшем пути развития, литическом или лизогенном.

Литическая репликация происходит сначала в тета-, а потом в сигма-формах. Упаковка Р1 геномов в головки ведется из конкатемерной ДНК. Реакция идет процессивно, начиная с *pac*-сайта (*pack*age — упаковка), при этом из одного конкатемера “нарезается” 3–4 генома. Поскольку при каждом акте в головку упаковывается около 100 т.п.н., то последовательно упаковываемые молекулы ДНК имеют концевые повторы (избыточности) разного строения. Механизм упаковки не так строго специфичен, как у флага λ , поэтому в головку с частотой около 10^{-3} может упаковаться любой фрагмент бактериальной ДНК. Это является причиной общей трансдукции, которую осуществляет фаг Р1.

Размер области *rep*, отвечающей за плазмидную репликацию, сравнительно невелик — 1,5 т.п.н. Ее строение и способ функционирования сходен с аналогичными данными для плазмиды F (см. рис. 3.7). Одинаково у этих плазмид устроены и области *par* (см. рис. 3.6 и 4.10). Белки *ParA* и *ParB* через сайт *parS*, входящий в состав локуса *incB*, ведут распределение плазмидных ДНК по дочерним клеткам. Фаг Р1 обладает также сайт-специфической рекомбиназой *Cre*, действующей через *loxP*-сайт и стабилизирующей плазмиду путем разрезания ее мультимеров. Имеется также система *Phd/Dox*, обеспечивающая постсегрегационную гибель клеток (см. гл. 3).

Фаг Р1 и фаг-транспозон *Mu* имеют одинаковый спектр клеток-хозяев. Как пример природной генной инженерии отметим выработанное ими свойство к расширению этого спектра, обусловленное вращением областей *C* или *G* (у флага *Mu*) их геномов. Протяженность этих областей — около 4,2 (Р1) и 3 (*Mu*) т.п.н. Они ограничены инвертированными повторами, содержащими сайты действия (*cix* и *gix*) инвертаз, гены которых *cin* (Р1) и *gin* (*Mu*) находятся рядом с областями (рис. 4.11; см. также рис. 2.5 и 4.10).

В *C(G)*-области располагаются гены *S* и *U* (в двух вариантах), определяющие хозяйскую специфичность флага, которая, как вы-

яснилось, зависит от способа получения лизата. В ДНК фагов, полученных после инфицирования и лизиса клеток, область $C(G)$ находится в (+)-ориентации. Такие фаги адсорбируются только на клетках штаммов *E. coli* K-12 и некоторых штаммов *S. typhimurium*. В ДНК фагов, полученных после индукции развития профагов, область $C(G)$ ориентируется и в (+)-, и в (-)-положениях. Фаги с ориентацией области $C(G)$ в (-)-положении приобретают способность адсорбироваться на клетках *C. freundii*, *Sh. sonnei*, *E. coli* C, но перестают инфицировать клетки *E. coli* K-12.

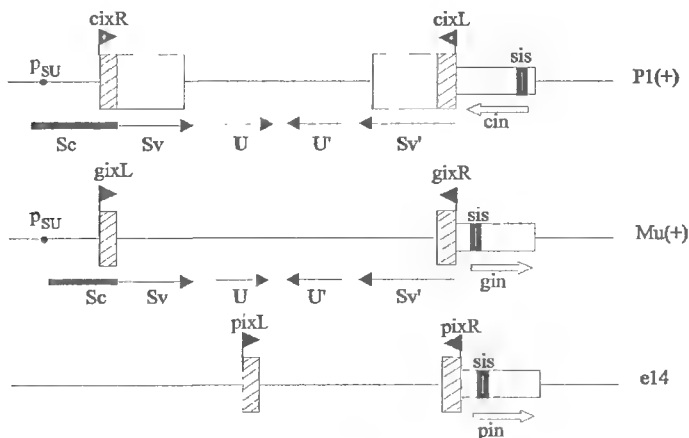


Рис. 4.11. Строение вращающихся областей у фагов P1, Mu и дефектного профага e14.

p_{SU} — промотор генов S и U ; стрелки указывают направление транскрипции генов

В структурах соответствующих фагов были обнаружены различные белки (Iida, 1984). В фагах с областью $C(G)$ в (+)-ориентации синтезируются S и U белки, а с областью $C(G)$ в (-)-ориентации — S' и U' белки. Их гены построены следующим образом. Промотор находится слева от области $C(G)$, а рядом с ним — константная часть гена S — сегмент S_c , общий для генов S и S' (см. рис. 4.11). На разных концах области $C(G)$ помещаются лишь переменные части генов S и S' (S_v и S_v'), а гены U и U' полностью располагаются в ней. Поэтому при ее (+)-ориентации синтезируются белки S_c-S_v и U , а при (-)-ориентации — белки S_c-S_v'

и U' . Рядом с областью $C(G)$ имеется энхансер *sis* (sequence for inversion stimulation). В его присутствии независимо от расположения и ориентации области частота инверсии увеличивается в десятки раз. Этому способствует бактериальный белок Fis (factor for inversion stimulation), связывающийся с энхансером.

Аналогичную систему инверсии имеют дефектный лямбдоидный профаг $\phi 14$ и плаزمида $p15B$, обладающие инвертазами Pin и Min , соответственно.

Фаг M13

Этот нитевидный фаг, а также близкородственные фаги ϕI и ϕd обладают односторонними ДНК длиной 6407 нуклеотидов, гомологичными на 97 %. У каждого из фагов имеется 10 генов, 7 из которых вовлечены в морфогенез капсиды. Белок $gpVIII$ является ее основным структурным компонентом, а $gpIII$ обуславливает адсорбцию фага на F-пили (см. гл. 3), через которые фаговая ДНК, обозначаемая как (+)-нить, проникает в клетки. Между *II* и *IV* генами располагается спейсер, содержащий сайт *pac*, необходимый для морфогенеза, и два *ori*-сайта (рис. 4.12). Один из них, *ori*(-), используется для инициации синтеза комплементарной (-)-нити, в результате чего образуется двунитевая репликативная форма (РФ). Праймирование ведет бактериальная РНК-полимераза, а элонгацию — ДНК-полимераза III.

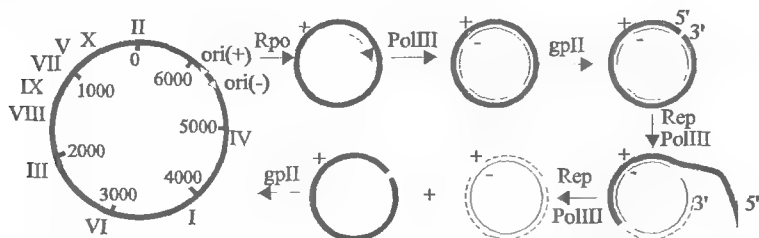


Рис. 4.12. Генетическая карта фага M13 и схема репликации его односторонней ДНК.

Гены фага обозначены цифрами I—X; через (+)-нить обозначена ДНК, выделяемая из фага; комплементарная нить обозначена через (-). Стрелки на карте — направление репликации с разных *ori*-сайтов; тонкие линии — (-)-нить; штриховая линия — вновь синтезированная (+)-нить. Масштаб указан в т.п.н.

Вновь синтезированная (–)-нить в составе РФ играет двойную роль: с нее идет однонаправленная транскрипция, и она служит матрицей для синтеза дочерних (+)-нитей ДНК по механизму катящегося кольца. Для этого процесса образовавшийся фаговый белок gpII вводит ник в *ori*(+)–сайте на (+)-нити, после чего точная геликаза Rep вытесняет 5'-конец этой нити, а ДНК-полимераза III удлиняет ее 3'-конец. После завершения раунда репликации вытесненная (+)-нить “отрезается” белком gpII в том же сайте, где при инициации репликации вводится ник, циркуляризуется и снова превращается в РФ. После накопления в клетке 100–200 молекул РФ дальнейшее их образование прекращается, так как кольцевые (+)-нити покрываются фаговым SSB-белком gpV, блокируя их превращение в РФ. Однонитевые ДНК направляются в периплазматическое пространство и упаковываются там в фаговые белки. Образовавшиеся вирионы (до 1000 частиц из одной клетки за одну генерацию) покидают бактерии, не вызывая их лизиса.

Эволюционные взаимоотношения плазмид и фагов

Плазмиды и фаги играют фундаментальную роль в эволюции бактерий, содействуя горизонтальному переносу генетических модулей, кодирующих самые разнообразные функции. Природа использует их в качестве своеобразных векторов для своих генно-инженерных целей. Паразитические и (или) симбиотические взаимодействия этих автономно реплицирующихся генетических элементов между собой, а также со своими хозяевами способствовали быстрой и многосторонней эволюции молекулярных адаптивных механизмов. Изучение эволюции таких сравнительно простых биологических объектов может способствовать пониманию закономерностей, которым следует молекулярная эволюция более сложных биологических систем. Наиболее интересными объектами в этом плане являются фазмиды.

Напомним, что фазмиды сочетают в себе свойства плазмид и фагов. Эти свойства разделены во времени. В лизогенном состоянии фазмида ведет себя как плаزمид, а при литическом развитии — как вирус. Существование фазмид ставит фундаментальную проблему эволюционного плана об их происхождении. Как

следует рассматривать фазмиды с эволюционной точки зрения? Являются ли они промежуточными звеньями между плазмидами и бактериальными вирусами или продуктом их эволюционного взаимодействия?

Тесная связь между плазмидами и фагами в современной истории, насчитывающей сотни миллионов лет, подтверждена многочисленными экспериментами. С целью расширения “жизненного пространства” одни плазмиды приобрели способность к трансмиссивности, т. е. переносу в другие клетки методом конъюгации (например, современные плазмиды типа F). Другие “обзавелись” информацией о морфогенетических и литических функциях и стали вирусами, что позволило им приобрести способность к внеклеточной стадии жизни (например, фаг P1). Третьи “научились” пользоваться чужими морфогенетическими и литическими функциями и получили способность выходить из клетки не в своем “одеянии”, став вирусами-сателлитами (например, фаг P4; Lindqvist *et al.*, 1993).

Историю же происхождения плазмид и вирусов *ab ovo* можно пытаться восстановить только логическим путем.

Плазмиды и вирусы не могут размножаться вне клеток, поэтому, вероятнее всего, их репликаторы произошли от клеточных. Представление о плазмидах как об обособившихся клеточных репликаторах не вызывает логических противоречий. Можно также допустить, что в процессе эволюции такой репликатор приобрел информацию о белковой оболочке, которая затем трансформировалась в капсид. Так в результате могли образоваться предки фазмид.

Конечно образование фазмид происходило и в относительно недавнее время благодаря рекомбинации между плазмидными и фаговыми геномами. В частности, учитывая высокую степень гомологии между структурными генами фагов $\phi 80$ и N15, можно предположить, что к созданию фазмиды N15 привела рекомбинация некоторой “реликтовой” линейной плазмиды, имеющей шпильчатые концы, с “прародителем” фага $\phi 80$.

А что можно сказать о подавляющем большинстве вирусов, которые являются вирулентными и не имеют плазмидной фазы жизни? Вызывает сомнение, что в процессе образования первич-

ных вирусов они прошли мимо плазмидной “фазы жизни”. Ведь их репликаторам необходимо было иметь достаточно времени, чтобы приобрести (сформировать?) информацию о морфогенетических и литических функциях и стать вирусами как таковыми. В течение этого времени их репликаторы были, очевидно, автономными, т. е. были плазмидами. Следовательно, первые вирусы были фазмидами. Затем большинство вирусов, по-видимому, утратило плазмидные свойства, в результате чего они потеряли универсальность, но стали более эффективными литическими агентами. Таким образом, вероятнее всего, бактериальные вирусы являются редуцированными формами фазмид.

Интересен и более общий аспект обсуждаемой проблемы. Оказалось, что концевые шпильки сходны по строению у бактериальных линейных плазмид и поксвирусов (Hinnebusch, Barbour, 1991). Близкое строение имеют и концевые шпильки линейных плазмид некоторых низших грибов (Miyashita *et al.*, 1990) и линейных митохондрий у парамеций (Prichard, Cummings, 1981). Эти неожиданные и важные факты указывают на возможность горизонтального переноса генного модуля, ответственного за их образование, между эу- и прокариотами.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОВТОРЕНИЯ И ОБСУЖДЕНИЯ

4.1. Будет ли трансдуцирующий фаг λ toIAB, полученный методом делеций, дефектным или жизнеспособным?

4.2. Длина линейной ДНК, выделяемой из частиц фага P1, превышает размер генома на 10 т.п.н. Из-за особенностей механизма упаковки фаговой ДНК ее концы гомологичны. Благодаря RecA-зависимой рекомбинации по участкам гомологии фаговая ДНК после инфицирования клеток циркуляризуется. Равна ли длина кольцевой ДНК размеру фагового генома или превышает его?

4.3. Сформулируйте условия, при которых фаг λ мог бы осуществлять общую трансдукцию.

4.4. Сформулируйте условия, при которых фаг P1 мог бы осуществлять специфическую трансдукцию.

4.5. Как следует рассматривать фазмиды с эволюционной точки зрения? Являются ли они промежуточными звеньями между плазмидами и бактериальными вирусами (плазмиды $\rightarrow$ фазмиды $\rightarrow$ вирулентные фаги) или продуктом их эволюционного взаимодействия

(плазмиды + вирулентные фаги = фазмиды)? Обсудите сильные и слабые стороны этих предположений.

4.6 ДНК фага N15 по строению похожа на ДНК фага λ , а его линейный плазмидный профаг с ковалентно замкнутыми концами также пермутирован, как и профаг λ . Предложите обобщенную модель Кэмпбелла для образования профага N15.

4.7. Опишите способы использования фага λ в качестве вектора для манипуляций генами *in vivo*.

4.8. Для какой цели и как используются вращающиеся сегменты в геномах фагов P1 и Mu?

4.9. Какие изменения в регуляторных цепях генома фага λ необходимо сделать, чтобы “превратить” его в плазмиду?

4.10. В пробирку добавлены бактерии и фаги в одинаковом количестве. Какая доля клеток будет инфицирована в предположении, что все фаги адсорбировались на клетках?

Глава 5

КЛЕТКИ

Клетки являются простейшим уровнем организации живого, способным к самовоспроизведению. Вне клетки все ранее рассмотренные генетические элементы — транспозоны, плазмиды и вирусы — инертны. В генетической инженерии клетки играют двойную роль: как непосредственный объект генного конструирования, когда сама клетка выступает в новом качестве, или как средство для клонирования генов, которые используются в других организмах.

Цель данной главы — познакомить читателя с некоторыми аспектами организации клеточных геномов, которые призваны способствовать диверсификации клеток даже в пределах одного вида и которые можно рассматривать как примеры природной генной инженерии. Речь идет о механизмах межвидовых обменов генами и о геномных перестройках у ключевых объектов генетической инженерии, и прежде всего, у наиболее изученного из них — *E. coli*. Несомненно, выделение именно этих аспектов носит искусственный характер, но оно соответствует задачам учебника и демонстрирует возможности, открывающиеся перед геномной инженерией.

Напомним, что все живые организмы относятся к двум надцарствам — прокариотам и эукариотам. Надцарство прокариот включает два царства — архебактерии и бактерии, а надцарство эукариот — три царства: животные, растения и грибы. Прокариотические клетки, в отличие от эукариотических, не имеют организованного ядра. Их ДНК в клетке находится в составе нуклеоида, содержащего также РНК, белки и фракции клеточной мембраны. Второе важное структурное отличие — отсутствие у прокариот реальной компартментализации функций: за исключением рибосом, у них нет органелл и эндоплазматического ретикулома. Структурно различны и механизмы репликации и сегрегации хромосом. Структурно по-разному организованы механизмы транскрипции и трансляции (см. табл. 1.1).

Эукариотические клетки подразделяют также на высшие (животные, растительные) и низшие (грибы, включая дрожжи). Существенно различны таксономических группы прокариот — эубактерии и архебактерии. Последние характеризуются необычностью среды обитания — очень высокая температура, засоленность и другие экстремальные факторы, т. е. там, где “нормальная” жизнь невозможна.

Прокариотические клетки

Организация генома. Прокариотические клетки могут содержать от одной до нескольких десятков хромосом в зависимости от стадии и скорости их деления. Однако эти клетки относят к гаплоидным организмам, так как их хромосомы являются копиями исходных молекул ДНК, и потому их генетический материал однороден. Традиционное представление о бактериальном геноме как об одной кольцевой молекуле ДНК сегодня пересмотрено. Были обнаружены линейные хромосомы у *B. burgdorferi* (Ferdows, Barbour, 1989), у *S. coelicolor* и *S. lividans* (Lin *et al.*, 1993), у *Rhodococcus fascians* (Crespi *et al.*, 1992). В клетках *A. tumefaciens* геном представлен одной линейной и одной кольцевой хромосомой. Имеются и другие комбинации молекул ДНК (см. обзоры 1997, Hinnebusch, Tilly, 1991; Kolstø).

Размер бактериальных ДНК колеблется в пределах от 0,6 (у микоплазм) до 10 (у миксококков) миллионов пар нуклеотидов (млн. п.н.). Некоторые виды бактерий имеют исключительно большие плазмиды (мегаплазмиды), длина которых сравнима с длиной хромосом. К ним, в частности, относятся симбиотические виды *Rhizobium*, их плазмиды содержат информацию об азотфиксации и об образовании на корнях растений узелков (гены *nif*, *fix* и *nod*). У *R. trifolii* размер такой плазмиды составляет 1,6 млн. п.н. Интересно отметить, что у видов *Klebsiella* гомологичные гены *nif* имеют хромосомальную локализацию. Отсюда возникает вопрос, каков тот критерий, когда мегаплазмиды, содержащие функционально важные гены, следует называть также хромосомами? Например, клетки *Rhodobacter sphaeroides* имеют кольцевые ДНК длиной 3 и 0,9 млн. п.н. Первая содержит все важные гены, а вторая — только некоторые их копии. Обе ДНК названы хромосомами (Suwanto, Kaplan, 1989).

В бактериальных хромосомах органично соединены две сущности — физическая и информационная. Физически они пред-

ставляют собой сложный динамичный белково-нуклеиновый комплекс — нуклеоид, состоящий из независимых суперскрученных доменов. Домены по-разному реагируют на изменения физиологических условий, способствуя включению или выключению определенных генов или групп генов путем модификации своей вторичной структуры или путем прямого взаимодействия отдаленных генетических локусов с помощью специфических белков. Информационно бактериальная хромосома представляет собой мозаику генетических элементов, собранных из многих источников. Параллельно в процессе эволюции ДНК изменялась и продолжает изменяться благодаря мутациям (замена оснований, небольшие вставки и делеции, перестройки), внутривидовым рекомбинациям, межродовым и даже межтаксонным переносам генов.

Вся эта мозаика и механизмы ее возникновения прошли через сито отбора — выдерживания баланса между преимуществами изменений и необходимостью сохранения генетической стабильности. Есть ряд факторов, которые лимитируют изменения. Это гибель рекомбинантов из-за работы репарирующих ферментов в случае неполной гомологичности рекомбинирующих хромосом. Это различия у разных видов в нуклеотидном составе ДНК и использовании кодонов. Это запрет некоторых типов геномных перестроек в районе терминаторов репликации из-за необходимости выдерживать равенство длин реплицирующихся в разном направлении плеч ДНК. Наконец, не следует забывать о существовании причин, закрепляющих положительные свойства, приобретенные клеткой, на уровне популяции.

Перечисленные факторы, казалось, носят универсальный характер, и поэтому ожидалось, что уровень внутривидовой вариабельности в последовательностях нуклеотидов будет одинаков у разных родов бактерий. Однако измерения показали широкий диапазон значений этого параметра — от минимального у микобактерий и риккетсий до крайне высокого у стрептомицет и ризобий. Причина этого явления пока неизвестна.

Клетки *E. coli*. Кольцевая ДНК этих клеток, реплицирующаяся в тета-форме, содержит 4700 т.п.н. Она покрыта многими белками, основным из которых является гистоноподобный положительно заряженный белок HU. Контурная длина ДНК (около 1 мм) в 1000 раз превышает длину клетки, поэтому эффективное

функционирование генома обеспечивается определенной укладкой (компактизацией) ДНК в нуклеоид. Нуклеоид состоит приблизительно из 50 топологически самостоятельных доменов, в каждом из которых суперскручивание ДНК с помощью гиразы и ее релаксация под действием топоизомеразы I происходят независимо друг от друга.

В предыдущих главах уже отмечалась регуляторная или структурная роль небольших нуклеотидных повторов, с которыми связываются и через которые действуют определенные белки. Они важны для инициации репликации ДНК и экспрессии генов, для процессов рекомбинации и репарации. У бактерий кишечной группы выявлены также рассеянные по всему геному высокоповторяющиеся последовательности, представляющие собой мозаику из несовершенных палиндромов PU (palindromic unit) и консервативных сегментов (Gilson *et al.*, 1991). Эти элементы, названные BIME (bacterial interspersed mosaic elements), всегда располагаются в межгенных участках; в геноме *E. coli* их насчитывается около 50. Роль BIME до конца не понятна. Во всяком случае показано, что палиндромы PU связываются с ДНК-полимеразой I и гиразой и что они участвуют в образовании нуклеоида, терминации транскрипции и в геномных перестройках.

К настоящему времени полностью секвенированы ДНК клеток *E. coli* дикого типа (штамм MG1655) и лабораторного штамма *E. coli* K-12; в геноме последнего насчитывается 4638858 п.н. (Blattner *et al.*, 1997). Для штамма W3110 составлена подробная физическая карта (Kohara, 1990). Между этими и другими проанализированными штаммами *E. coli* K-12 выявлены существенные различия в характере геномных перестроек — инсерций, делеций, повторов и инверсий (см. обзор Krawiec, Riley, 1990). Даже в разных линиях одного штамма W3110 за несколько лет раздельного культивирования накопились существенные различия (Daniels, 1990).

Анализ природных изолятов *E. coli* путем исследования электрофоретических свойств нескольких белков выявил клональную структуру популяций: 1691 штамм был подразделен на три подвида (Whittam *et al.*, 1983). Это, казалось, свидетельствовало о низком уровне рекомбинационных обменов в природе у этих клеток и об их репродуктивной изоляции. Но нуклеотидный анализ области триптофанового оперона 36 штаммов из той же коллекции, подтвердив наличие клональности, вскрыл, одна-

ко, присутствие в этой области вставок из нескольких сот пар нуклеотидов, происходящих из других подвидов (Milkman, Bridges, 1993). Таким образом, горизонтальный поток генов у *E. coli* значителен, и ее геном является мозаичным. Перенос генов, как уже отмечалось в предыдущих главах, осуществляется плазмидами и фагами.

Ориентация генов на хромосоме *E. coli* не является случайной, активно транскрибируемые гены расположены по направлению движения репликационных вилок. Очевидная причина — свести к минимуму столкновение РНК- и ДНК-полимераз. Среди 97 генов, имеющих отношение к трансляционному аппарату, 92 гена ориентированы именно таким образом. В области размером 227 т.п.н. около *ori*-сайта 204 из 272 генов расположены также. Менее понятно, почему в этой же области такое же направление имеют 48 из 56 *chi*-сайтов, являющихся инициаторами RecBCD-пути рекомбинации.

В клетках *E. coli* K-12 имеется один активный профаг λ и четыре близких ему дефектных профага DLP12, *gac*, *qin* и ϵ 14. Их ориентация на хромосоме также не случайна. Все, кроме профага *qin*, расположены по часовой стрелке (Campbell, 1992). В этом же направлении расположены другие лямбдоидные профаги — HK022, P22, ϕ 80, 21 и Atlas. Причина такого единообразия интересна, но непонятна.

Анализ генома *E. coli* с помощью методов конъюгации и общей трансдукции позволил расставить на ее генетической карте более 1000 генов (Berlyn *et al.*, 1996; упрощенный вариант см. рис. 3.10). Карта разделена на 100 мин, по 47 т.п.н. в каждой единице. Картирование новых генов классическими методами по мере детализации карты становится все более трудоемким. С целью упрощения процедуры картирования сконструирована коллекция из 182 изогенных штаммов, которые в различных сайтах содержат транспозон Tn10 или Tn10*kan*, имеющий вместо тетрациклинового маркера канамициновый. В набор для их использования входит также 21 штамм Hfr, обладающий теми же маркерами. Картирование новых генов происходит в два этапа. Сначала с помощью Hfr-штаммов устанавливается локализация гена в пределах 5—15 мин карты. Далее для уточнения локализации гена в пределах 1 мин используется фаг P1, позволяющий определить, между какой парой маркеров он находится (Singer *et al.*, 1989).

Эукариотические клетки

Дифференцировка клеток у дрожжей *S. cerevisiae*. Дрожжи являются одноклеточными грибами. Они размножаются либо почкованием как *S. cerevisiae*, либо делением как *Schizosaccharomyces pombe*. Другую группу составляют многоклеточные мицелиальные грибы, образующие многоядерные тубулярные нити (филаменты). К наиболее изученным относятся *Neurospora crassa* и *Aspergillus nidulans*.

Клетки *S. cerevisiae* обладают всеми признаками эукариот. В их геноме, состоящем из 16 хромосом, нет оперонов, транскрипцию ведут три типа РНК-полимераз, а мРНК имеют типично эукариотическое строение. Дрожжи содержат специфические эукариотические белки (гистоны, актин, тубулин, пептидные гормоны) и эукариотические органеллы (ядерную мембрану, митохондрии, 80S рибосомы, эндоплазматические мембраны, аппарат Гольджи, лизосомы). Каждая их хромосома несет по одной центромере, по две теломеры и состоит из нескольких репликонов. Клетки *S. cerevisiae* являются первым эукариотическим организмом, геном которого полностью секвенирован (Goffeau *et al.*, 1996). Последовательность из 12068 т.п.н. включает в себя 5885 белок-кодирующих генов, 140 генов рРНК, 275 генов тРНК и 40 генов малых ядерных РНК.

Центромерами называют участки хромосом, которые в процессе митоза служат для удерживания вместе сестринских хроматид и для “растаскивания” образовавшихся хромосом к разным полюсам делящейся клетки. Центромеры хромосом взаимозаменяемы. Дрожжевая центромера (CEN) состоит из ~120 п.н. и представляет собой АТ-богатый участок, фланкированный консервативными последовательностями: TCACATGAT-(>90% А+Т, 80—90 п.н.)-TGATTTCCGAA.

Теломерами называют концевые участки хромосом. У всех эукариот принцип их строения одинаков. Каждая теломера состоит из длинных серий коротких тандемных повторов. Обобщенная формула этих повторов — $C_n(A/T)_m$, где $n > 1$, а $m = 1—4$. У человека — C_3TA_2 , у *S. cerevisiae* — $C_{2-3}A(CA)_{1-3}$.

Средний размер дрожжевого репликона 40 т.п.н. Локусы дрожжевых хромосом, ответственные за инициацию репликации (ана-

логи *ori*-сайтов), обозначают как ARS (autonomously replicating sequence). Каждый из таких локусов состоит из ~50 п.н. и включает в себя ключевую (core) последовательность АТТТАТР_uТТТА, несколько гомологичных ей на 80 % последовательностей и сайт для связывания одного из транскрипционных факторов. Этот фактор, по-видимому, входит в состав комплекса из ~6 белков общей массой ~250000 дальтон, который инициирует двустороннюю репликацию дрожжевой ДНК.

В зависимости от внешних условий дрожжи следуют одному из двух путей развития — гаплоидному или диплоидному (рис. 5.1). В условиях достаточного питания в течение 100 мин клетки проходят стандартные для эукариотических клеток фазы митотического цикла — G1, S (синтез ДНК), G2 и M (митоз). В отличие от бактерий, клетки *S. cerevisiae* не делятся пополам, а почкуются, т. е. дочерняя клетка вырастает из материнской, покрываясь вновь синтезируемой клеточной стенкой. В неблагоприятных условиях гаплоидные клетки спариваются с партнером противоположного типа спаривания. Образовавшиеся диплоидные клетки после мейоза формируют гаплоидные споры, которые затем прорастают, и циклы повторяются.

Таким образом, дрожжевые клетки обладают рядом свойств, которые характерны для многоклеточных организмов, в частности, возможностью специализации клеток, способностью к межклеточному контакту и мейозу. У многоклеточных организмов разные типы специализированных клеток выполняют разные функции в организме. У дрожжей специализированные клетки играют различные роли в процессе их жизненного цикла. Есть три типа таких клеток: способные к спариванию гаплоидные клетки a и α , а также образующиеся после спаривания диплоидные клетки a/α , способные к мейозу и споруляции.

Клетки a и α обладают различными сигнальными системами, позволяющими им устанавливать контакт друг с другом и спариваться. Каждая из них производит свой внеклеточный пептид, a -фактор или α -фактор, узнающий специализированный рецептор только на клетке противоположного типа спаривания. Клетки a/α не производят эти факторы и не способны к спариванию. Разница между клетками определяется двумя аллелями локуса *MAT*. α -Клетки обладают локусом *MAT_a*, α -клетки — локусом *MAT_{\alpha}*, a/α -клетки — обеими локусами.

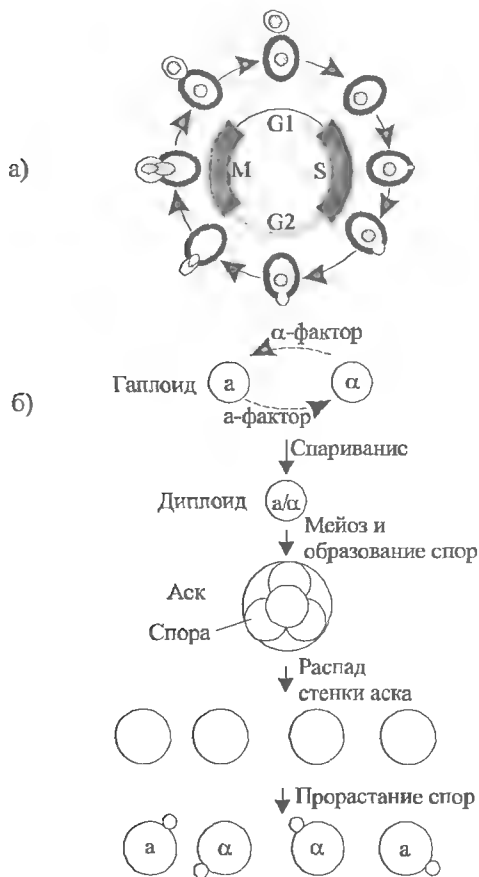


Рис. 5.1. Жизненный цикл дрожжевых клеток *S. cerevisiae*: *a* — митотический клеточный цикл, через который проходят гаплоидные и диплоидные клетки; указаны фазы развития. Материнская клетка обведена толстой линией, отпочковывающаяся дочерняя клетка — тонкой линией; ядро выделено штриховкой; *б* — переход диплоидных клеток к мейотическому делению, в процессе которого каждая клетка образует аск, содержащий четыре споры. Споры прорастают и почкуются при переносе их в питательную среду

Генетический аппарат дифференцировки клеток находится в третьей хромосоме. Здесь на расстоянии около 350 т.п.н. друг от друга находятся локусы *HMRa* и *HMLa*, а между ними располагается сходный с ними по строению локус *MAT*. Все три локуса состоят из двух одинаковых (*X* и *Z*) и двух разных (*Ya* и *Yα*) генных сегментов. Сегмент *Ya* кодирует полипептид $\alpha 1$, а сегмент *Yα* — полипептиды $\alpha 1$ и $\alpha 2$. Эти сегменты не экспрессируются в локусах *HMRa* и *HMLa* из-за действия находящихся в них сайленсеров. Переключение аллельных состояний производится путем внутриклеточной транспозиции сегмента *Ya* или *Yα* в локус *MAT* (рис. 5.2). После этого начинается синтез полипептидов $\alpha 1$ (в α -клетках) или $\alpha 1$ и $\alpha 2$ (в α -клетках), которые регулируют экспрессию четырех групп генов. Полипептид $\alpha 1$ служит позитивным регулятором транскрипции генов, обеспечивающих α -тип поведения клеток; полипептид $\alpha 2$ в тех же клетках служит негативным регулятором транскрипции генов, обеспечивающих α -тип поведения клеток; димер $\alpha 1$ — $\alpha 2$ в клетках α/α выключает синтез полипептида $\alpha 1$ и блокирует транскрипцию большой группы генов, функционирующих только в гаплоидных клетках. Один из генов этой группы, *RME1*, кодирует ингибитор другой группы генов, отвечающих за споруляцию. Подавление его экспрессии в диплоидных клетках в случае голодания обеспечивает переход к спорообразованию.

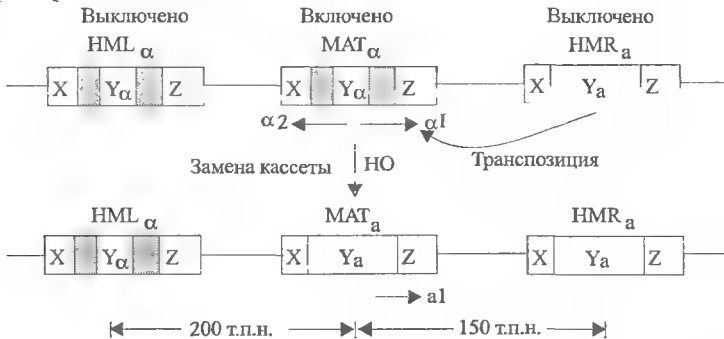


Рис. 5.2. Строение области третьей хромосомы *S. cerevisiae*, управляющей сменой типов спаривания.

В локусах *MAT* стрелками указано направление считывания генов; сегмент *Yα* выделен штриховкой

Перемещение *Y*-сегментов в локус *MAT* вызывается действием сайт-специфической эндонуклеазы *HO*, ген которой находится в другой хромосоме и экспрессируется только в гаплоидных материнских клетках и только в стадии *G1*. Сегменты *X* и *Z* служат сайтами рекомбинации при транспозиции. Копии сегментов *Y* после их переноса в локус *MAT* остаются и в исходных локусах, а заменяемый в локусе *MAT* сегмент *Y*, естественно, теряется. Клетки с геном *HO* гомоталличны, т. е. в них почти каждое клеточное деление сопровождается сменой сегмента *Y* в локусе *MAT*. Поэтому подобные гаплоидные клетки дают потомство, обладающее любым типом спаривания. Клетки с поврежденным геном *HO* (аллель *ho*) гетероталличны. В этих клетках в локусе *MAT* зафиксирован определенный сегмент *Y*, поэтому для них характерен только определенный тип спаривания, и зиготы в их популяции не образуются.

Интересно отметить, что полная дифференцировка гаплоидных клеток происходит только в присутствии партнера с противоположным типом спаривания. Ген *FUS1*, чей продукт необходим для слияния клеток в процессе скрещивания, индуцируется после связывания α - или α -факторов с соответствующими клеточными рецепторами. Этот контакт вызывает также увеличение экспрессии α - или α -специфических генов в 3—5 раз.

Таким образом, под контролем локуса *MAT* находится иерархия регуляторных цепочек. Внутриклеточная транспозиция генов обеспечивает базальный уровень синтеза белков дифференциации, которые затем при наличии внешних сигналов приводят к завершению дифференцировки клеток. Этот пример наглядно демонстрирует сложность проблем, которые придется решать экспериментатору при попытках геномного конструирования даже у одноклеточных организмов.

Клеточная инженерия растений. Растения по праву называют гениальными инженерами природы. Их уникальное свойство восстанавливаться после повреждений обусловлено тем, что даже зрелые растительные клетки сохраняют способность к делению и перидифференцировке. Такая пластичность (тотипотентность) наглядно проявляется при культивировании растительной ткани в среде, содержащей необходимые питательные вещества (органические и неорганические) и факторы роста (фитогормоны).

Клетки ткани дедифференцируются и начинают делиться, образуя сравнительно однородную массу, называемую к а л л у с о м . Свойства и путь развития каллуса определяют фитогормоны ауксины и цитокинины (рис. 5.3), влияющие на скорость деления клеток, их дифференциацию и органогенез. При оптимальном соотношении концентраций фитогормонов (оно разное для разных тканей и разных растений) внутри каллуса многих двудольных растений формируются побеги, затем корни, а через 4—6 месяцев можно получить взрослое растение (рис. 5.4). Если концентрация ауксинов в среде существенно больше, чем цитокининов, то формируются только корни, если отношение концентраций обратное — образуются только побеги.

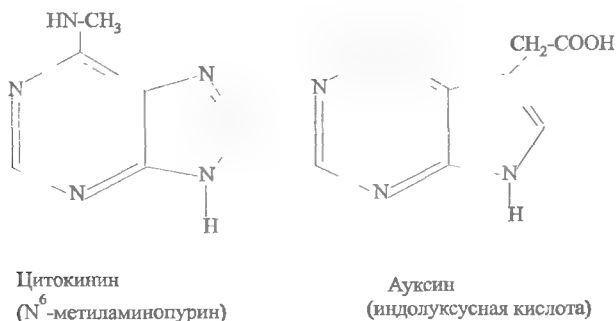


Рис. 5.3. Строение растительных фитогормонов ауксина и цитокинина

В жидкой среде под действием пектиназ каллус распадается на изолированные клетки. Взятые отсюда отдельные клетки на плотной среде после ряда делений вновь образуют каллус, из которого в ряде случаев (клетки табака, моркови, петунии, томата, картофеля) удастся получить целое растение. Целое растение можно получить даже из протопластов, т. е. из клеток, не имеющих клеточных стенок. Протопласты получают из многих видов растений. Лучшим их источником служат клетки молодых листьев, которые сначала обрабатывают пектиназами для удаления межклеточных связей, а затем целлюлазами для удаления самой клеточной стенки. После этого их помещают на плотные среды, где через 5—10 дней происходит регенерация клеточной стенки и начинается деление клеток. Дальнейшее развитие процесса идет стандартным

образом: образование каллуса → формирование побегов и корней → становление целого растения (см. рис. 5.4).

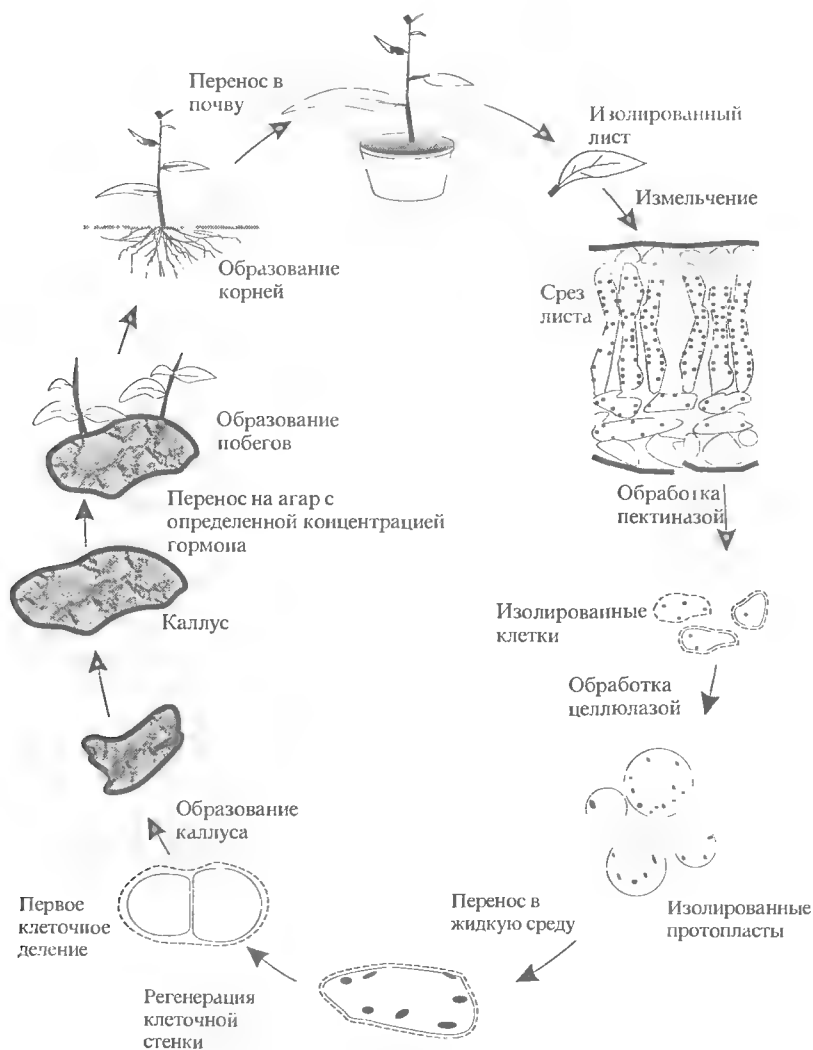


Рис. 5.4. Схема регенерации растений из изолированных клеток или протопластов

В опытах по регенерации растений был обнаружен эффект повышенного темпа спонтанного мутагенеза культивируемых клеток. Он заключается в следующем. Растения, выращенные из отдельных клеток одной и той же каллусной ткани, проявляют большую генетическую вариабельность и различаются по многим признакам. Причины этого не ясны. Вероятнее всего, мутации возникают вследствие дерепрессии подвижных генетических элементов. Но как бы то ни было, данный эффект даст возможность осуществлять просмотр (скрининг) вариантов и отбирать те из них, которые обладают полезными агрономическими признаками.

Скрининг ведут на двух уровнях — уровне клеток и организма. Скрининг клеток отличается высокой эффективностью. Однако большинство ценных для человека признаков растений (продуктивность, качество, устойчивость к полеганию, время цветения и созревания и т. п.) носит полигенный характер. Природа этих генов и особенности их взаимодействия в процессе формирования какого-либо признака пока не известны. Поэтому полученные полезные признаки не выражаются в культивируемых клетках, так что отбор по ним ведут только на организменном уровне. В то же время по таким признакам, как устойчивость к ионам тяжелых металлов, солям, к неоптимальным рН, гербицидам, скрининг на клеточном уровне даст возможность прогнозировать свойства растений по свойствам клеток.

Пластичность растений простирается столь далеко, что удастся манипулировать их геномами и даже получать искусственно новые виды, в том числе и практически важные для человека. Это направление исследований можно назвать *геномной инженерией*, хотя первые успехи здесь были достигнуты еще до наступления “генно-инженерной эры”. Одним из способов получения таких растений является межвидовая гибридизация перекрестно-оплодотворяющихся видов. Однако образующиеся в результате применения этого способа гибриды, в клетках которых геном каждого родителя представлен одной копией, нестабильны. Тем не менее, ряд приемов позволяет вызвать удвоение числа хромосом и получить амфидиплоиды, способные давать потомство. Классическим примером этого служит проведенная в 1927 году работа Карпеченко по выведению плодового межродового гибрида

капусты и редьки. Широко известен также амфидиплоид *Triticale*, образованный вследствие полового скрещивания пшеницы и ржи.

Разработка и применение способов получения и слияния протопластов растительных клеток, а также регенерации у них клеточной стенки в сочетании с методами культивирования и дифференцировки клеток *in vitro* позволили конструировать рекомбинанты, минуя половой процесс, т. е. создавать соматические гибриды. Как известно, процесс слияния протопластов неспецифичен. Слияние протопластов осуществляют в жидких средах с помощью полиэтиленгликоля. Это позволяет объединять протопласты отдаленных видов растений, между которыми половая гибридизация невозможна, и таким образом расширять круг растений, вовлекаемых в гибридизацию.

Первые успехи в получении соматических гибридов растений данным методом были достигнуты в середине 60-х годов. Вначале были выделены межвидовые гибриды (табака, моркови, петунии и дурмана). Затем удалось получить и межродовые соматические гибриды (картофель × томат, дурман × беладонна). Характерной чертой соматических гибридов является нестабильность их генома (предрасположенность к потере хромосом). Например, из 26 изученных в одном опыте соматических гибридов *Nicotiana glauca* × *Nicotiana glauca* только три оказались стабильными амфидиплоидами и содержали точно удвоенный набор хромосом каждого из организмов.

Соматическая гибридизация животных клеток. Основные успехи в молекулярной биологии клеток животных достигнуты благодаря использованию клеточных культур. Изолированные клетки можно получить из любой ткани путем разрушения межклеточных контактов протеолитическими ферментами. Клетки большинства видов животных способны размножаться в подходящих условиях, причем, как правило, на твердых поверхностях. Часто эти клетки сохраняют признаки дифференцировки тех тканей, из которых они были получены. Однако после 50—100 циклов деления культивируемые клетки погибают. Изредка в этих культурах выживают мутантные клетки, которые дают начало бессмертным клеточным линиям. На твердых поверхностях они образуют монослой, после чего их рост прекращается. В отличие от них, бессмертные линии раковых клеток размножаются в жидких

средах, а на твердых поверхностях они образуют много слоев. Наиболее известны в лабораторной практике клеточные линии фибробластов мыши NIH-3T3, эпителиальных клеток человека HeLa, миобластов крысы L6, плазматических клеток мыши SP2 и др.

Важным условием в работе с клеточными культурами является наличие в клетке селективных маркеров. Селективность маркеров животного происхождения, используемых в настоящее время, обуславливается особенностями биосинтеза рибонуклеотидов в клетках животных. Он осуществляется двумя путями: *de novo*, а также из готовых азотистых оснований и их аналогов.

При синтезе пуринов *de novo* вначале образуется инозиновая кислота (IMP), а из нее — адениловая (AMP) и гуаниловая (GMP) кислоты через соответственно аденилосукцинат и ксантиловую кислоту (XMP). Синтез пуринов из готовых азотистых оснований осуществляют аденинфосфорибозилтрансфераза (APRT) из аденина, гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT) из гипоксантина и гуанина, а также бактериальная ксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (XGPRT) из ксантина (рис. 5.5,а). Как видно из приведенной схемы, для создания селективных условий синтез IMP *de novo* необходимо блокировать. Это делают с помощью азасерина или аминоптерина. Последний подавляет также образование *de novo* тимидинмонофосфата, после чего он может синтезироваться только из тимидина с помощью тимидинкиназы (ТК). В результате на среде с гипоксантином, аминоптеринем и тимидином (HAT-среда) развиваются лишь клетки с генами *HGPRT*⁺ и *TK*⁺, а на среде с азасерином и аденином — только с геном *APRT*⁺. Эти гены можно использовать в качестве селективных маркеров, если реципиентные клетки несут мутации *HGPRT*⁻, *TK*⁻ или *APRT*⁻.

Селективным маркером у животных клеток является также мультиплицированный ген *dhfr*. Он кодирует фермент дигидрофолатредуктазу (DHFR), в отсутствие которого клетки не синтезируют тетрагидрофолат, участвующий в синтезе dATP из глицина и dTTP из аспартата (рис. 5.5,б). Клетки с одним геном *dhfr* в присутствии аминоптерина или метотрексата (структурные аналоги фолиевой кислоты) погибают. Выживают лишь клетки с боль-

шим числом копий этого гена (их число варьирует от 40 до 400), так как при повышенной концентрации DHFR блокирование этого фермента оказывается неполным. Мультиплицированные гены либо интегрированы в хромосому стабильных линий клеток, либо находятся в клетке в виде многих линейных внехромосомных элементов, каждый из которых содержит 2—4 гена *dhfr*. Такие элементы называют а м п л и к о н а м и .

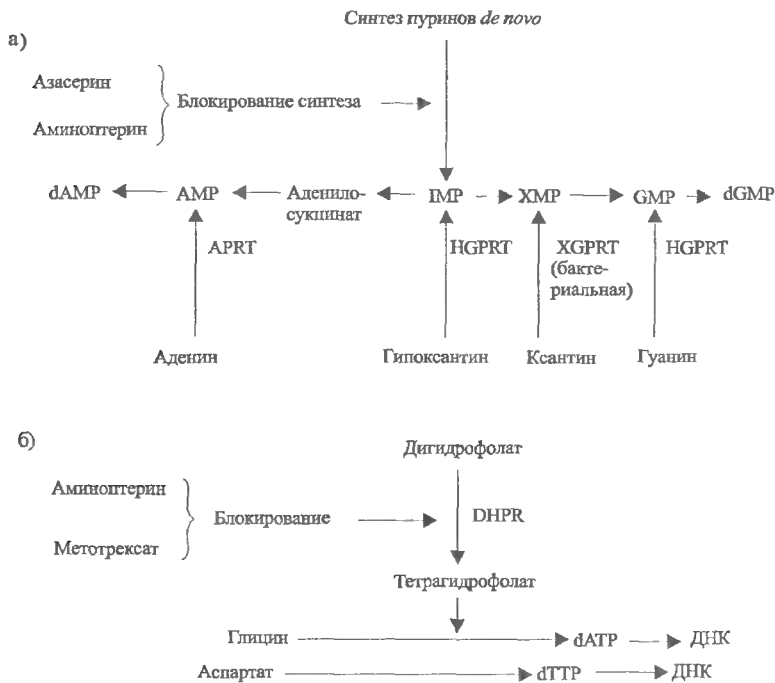


Рис. 5.5. Схема биосинтеза пуринов (а) и пиримидинов (б) в животных клетках

Имеются специфические субстраты для селекции клеток с мультиплицированными генами аденозиндеаминазы (ADA), аспарагинсинтетазы (AS), карбамилфосфатсинтетазы (CAD) и др.

Методы генной инженерии *in vitro* позволили ввести в практику работы с животными клетками также селективные маркеры бактериального происхождения, в частности гены *gpt* и *neo*. Жи-

вотные клетки не могут использовать ксантин для синтеза GMP, но если в них ввести ген *gpt*, кодирующий ксантингуанинфосфорибозилтрансферазу (XGPRT), они приобретают эту способность. Известно что, GMP образуется через IMP из гипоксантина с помощью фермента HGPRT. Если же подавить действие HGPRT микофенольной кислотой, а синтез пуринов *de novo* аминоптеринном, то на среде с аденином, ксантином и этими ядами ген *gpt* можно использовать как селективный маркер даже для немутантных животных клеток. Ген *neo* из транспозона Tn5, кодирующий аминогликозидфосфотрансферазу и обеспечивающий устойчивость бактерий к канамицину и неомизину, придает животным клеткам устойчивость к антибиотику G418. Этот ген используется как селективный маркер также при работе с клетками дрожжей и растений.

Клетки животных не имеют клеточной стенки, поэтому, подобно протопластам, они могут сливаться в присутствии полиэтиленгликоля, образуя гетерокарион — клетку с двумя ядрами. Гетерокарион делится митотически и превращается в гибридную клетку с одним ядром, в котором содержится полный комплект хромосом одной из родительских клеток и часть хромосом другой клетки. Эта лабораторная процедура была названа методом г и б р и д з а ц и и с о м а т и ч е с к и х к л е т о к .

Степень стабильности соматических гибридов животных клеток зависит от филогенетической близости родительских видов. У межвидовых гибридов утрачивается небольшое число хромосом, а у гибридных клеток человек × комар или мышь × курица хромосомы одного из родителей вскоре после образования гибридов почти полностью элиминируются. Элиминация хромосом видоспецифична: в приведенных примерах утрачиваются хромосомы комара и курицы. В гибридах мышь × человек теряются хромосомы человека. Поэтому такие гибриды особенно удобны для картирования генов человека и изучения механизмов их регуляции. Это объясняется тем, что среди подобных гибридов всегда можно найти клоны, содержащие определенную хромосому человека, тем более что человеческие хромосомы под микроскопом заметно отличаются от хромосом мыши.

В случае транслокации генов из хромосом одной родительской клетки в хромосомы другой образуются стабильные гибриды. Например, при длительном пассировании на НАТ-среде гибридных

клеток мышь × человек, содержащих хромосому человека с геном TK^+ , были выделены клоны, утратившие эту хромосому, но сохранившие ген TK^+ , поскольку он транслоцировался на одну из хромосом мыши.

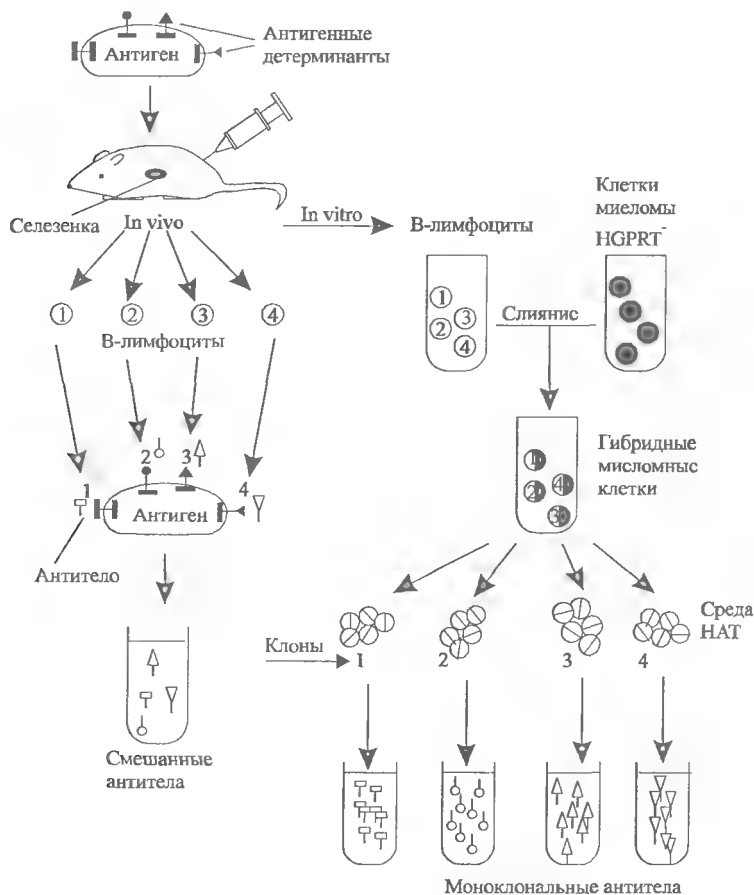


Рис. 5.6. Схема конструирования гибридом.

В ответ на иммунизацию мыши антигеном, имеющим четыре антигенных детерминанта, образуются В-лимфоциты четырех типов. Слияние с клетками миеломы делает их бессмертными, что позволяет затем разделить их и клонировать

Примером практического применения метода гибридизации соматических клеток является создание гибридом — клеток, способных производить моноклональные антитела. Все антитела (иммуноглобулины) в принципе устроены одинаково, но в организме животного имеются миллионы их вариантов. Потенциально синтез антител обеспечивается таким же количеством различных линий В-лимфоцитов, находящихся в крови и селезенке. Каждый из лимфоцитов способен производить строго определенное антитело. Однако в ответ на инъекцию белка-антигена в животном активируются различные В-лимфоциты и вырабатываются разные антитела. Это происходит вследствие того, что на одной молекуле антигена может быть несколько антигенных детерминант или одна детерминанта вызывает синтез нескольких антител, специфичных к ней в разной степени. Таким образом, обычные сыворотки содержат смесь антител, разделить которые практически невозможно.

Гибридомы способны производить строго определенные антитела с заданной специфичностью. Именно эта особенность является наиболее ценным свойством, отличающим их от природных продуцентов моноклональных антител — клеток миелом. Миеломы представляют собой злокачественные костно-мозговые опухоли. Любая такая опухоль состоит из клона плазматических клеток, произошедших от одного перерожденного предшественника лимфоцита. Поэтому в каждой опухоли синтезируются в большом количестве определенные антитела, но специфичность их случайна и неизвестна. Что же касается нормальных лимфоцитов, то среди них можно выделить клетки, синтезирующие заданные иммуноглобулины. Однако поддерживать их в культуре не удастся.

Гибридомы сочетают в себе свойства лимфоцитов производить определенные антитела и способность миелом бесконечно поддерживаться в культуре (Kehler, Milstein, 1975). Для создания таких гибридных клеток (рис. 5.6) прежде всего иммунизируют мышей, вводя им заданный антиген. В ответ на это в селезенке мышей начинается пролиферация В-лимфоцитов с заданной специфичностью антител. Далее выделяют клетки селезенки и гибридизируют их с клетками миеломы, в которые предварительно вводят мутацию *HGPRT*⁻. Это позволяет отбирать гибридные клетки

на среде НАТ, не поддерживающей развитие клеток миеломы из-за мутации (клетки лимфоцитов в принципе не способны образовывать колонии). Отобранные клоны гибридом тестируют на специфичность антител, продуцируемых ими, после чего нужные клоны размножают и выделяют из них антитела. Для размножения гибридом удобно использовать мышей той линии, из которых были взяты В-лимфоциты. У животных после инъекции гибридом развиваются опухоли, выделяющие специфические моноклональные антитела. Концентрация их в сыворотке крови достигает исключительно высокого уровня (более 10 мг на 1 мл сыворотки).

В настоящее время появилась возможность выделять индивидуальные хромосомы и, следовательно, использовать их для направленной трансформации животных клеток. Получаемые данным методом трансформанты, как правило, нестабильны. Однако в их популяции можно найти стабильные трансформанты, у которых часть хромосомы донорной клетки интегрировалась в какую-либо хромосому реципиента. Такие клетки позволяют картировать сцепленные гены.

Клонирование животных. Серьезные успехи, достигнутые в разработке методов манипулирования *in vitro* с ранними эмбрионами животных, позволили довести ряд экспериментов с уровня клеток до организма (большинство работ сделано на мышах). Конечно, наиболее впечатляющими являются достижения по получению трансгенных животных с использованием клонированных генов (см. гл.13). Однако и результаты опытов по перекombинации зародышевых клеток и замене ядер, позволившие получить клоны животных или животные химеры (см. стр. 149), дали многое для понимания механизмов дифференцировки клеток в процессе онтогенеза.

Напомним, что когда число клеток (бластомер) эмбриона не превышает восьми, они еще тотипотентны (не дифференцированы) и каждая из них может дать начало новому организму. Это позволяет проводить искусственное разделение 4–8-клеточных эмбрионов на отдельные клетки, культивировать их *in vitro* до стадии бластоцисты и имплантировать в матку псевдобеременных животных-реципиентов (“приемных” матерей). Таким путем можно клонировать животных, т. е. получать генотипически одинаковые особи (однояйцевых близнецов).

Другая возможность заключается в использовании эмбриональных стволовых клеток, получаемых из бластоцист. Они являются плюрипотентными (не полностью дифференцированными), и от них в организме взрослых животных ведут начало многие типы клеток, включая зародышевые. Перенос ядра из стволовой клетки в только что оплодотворенную *in vitro* яйцеклетку, из которой удалены оба пронуклеуса, получение бластоцисты и ее имплантация в матку “приемной” матери приводит к рождению нормального животного. Число идентичных стволовых клеток не ограничено, поскольку их можно клонировать, поэтому количество получаемых однояйцевых близнецов зависит только от доступности яйцеклеток и наличия “приемных” матерей.

Известие о клонировании животных для широкой общественности прозвучало как сенсация, благодаря комментариям прессы к разработке технологии получения клонированных овец (Wilmut *et al.*, 1997). Между тем, сенсационность этой работы заключается только в том, что впервые для млекопитающих с целью клонирования удалось использовать ядра соматических клеток (клеток молочной железы взрослой овцы). Для земноводных подобный успех был достигнут еще до наступления генно-инженерной “эры”, когда ядро яйцеклеток лягушки заменяли ядром, взятым из эпителиальных клеток кишечника головастика (Gurdon, 1962).

Животные химеры. К серьезным достижениям эмбриологов следует отнести успехи в создании животных химер, т. е. организмов, у которых клетки разных тканей имеют разный генотип.

Оказалось, что изолированные бластомеры или агрегаты из нескольких бластомер могут объединяться друг с другом и образовывать бластоцисты, способные к дальнейшему развитию. Могут объединяться и бластомеры, взятые у животных с другим генотипом или даже животных, относящихся к разным видам. Полученный в результате гибридный эмбрион после вышеописанных манипуляций может развиваться во взрослое животное, у которого разные ткани будут генотипически различными. Таких животных называют аллофенными. Их можно получать также из эмбрионов, сконструированных путем микроинъекции бластомеры(ов) или стволовой клетки в бластоцисту другого животного (рис. 5.7).

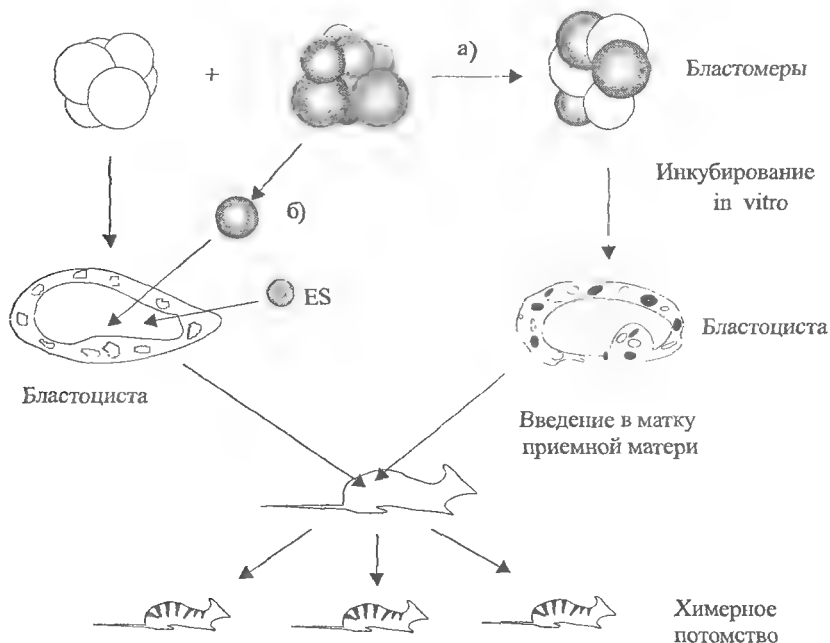


Рис. 5.7. Способы получения животных химер путем смешения бластомеров, имеющих разный генотип (а), или введения бластомеров или стволовых клеток (ES) в бластоцисты, отличающиеся от них по генотипу (б)

Первым примером создания межвидовых аллофенных химер животных является гибрид овца ($2n = 54$) $\times$ коза ($2n = 60$). Для их получения объединяли в разных соотношениях 8-клеточные эмбрионы овцы и козы и “мозаичные” эмбрионы вводили какому-либо из этих животных (Fehilly *et al.*, 1984). В наиболее удачных случаях, когда в опытах были получены жизнеспособные химеры, “мозаичные” эмбрионы содержали один 8-клеточный эмбрион овцы и три 8-клеточных эмбриона козы, а животным-реципиентом была коза. Химеры оказались бесплодными. В их крови были обнаружены эритроциты и овцы, и козы. Внешний покров имел мозаичную структуру — отмечалось чередование участков, покрытых волосом или шерстью. Двойственность свойств наблюдалась и в других фенотипических признаках.

Перенос генов между видами

Для того чтобы произошел горизонтальный перенос генов, генетический материал должен преодолеть два препятствия — барьер для проникновения чужеродной ДНК (чужДНК) в клетку и барьер для ее наследования. Эти препятствия реализуются в виде механизмов предотвращения генетического контакта между донорной и реципиентной клетками, расщепления чужДНК, исключения ее из процессов репликации и сегрегации, блокирования ее экспрессии. Несмотря на многочисленность этих механизмов, переносы генов между видами и даже между царствами происходят (рис. 5.8). Как же преодолеваются эти барьеры в природе?



Рис. 5.8. Установленные и предполагаемые пути горизонтального переноса генов между царствами.

—> — путь установлен; - - -> — путь предполагается

Экспериментально установленным механизмом переноса генов между грамотрицательными и грамположительными бактериями, а также от зубактерий в растения и грибы является конъюгация. Перенос генов в зубактерии возможен (но не доказан) методом трансформации. Однако барьер для проникновения чужДНК в клетку преодолевается проще, чем барьер для ее наследования.

Проблема рестрикции. В бактериях чужДНК, проникающая в клетки, гидролизуется (рестрицируется) с помощью специфических эндонуклеаз — рестриктаз, являющихся элементом RM-системы, т. е. системы рестрикции и модификации (рис. 5.9). Рестриктазы связываются с двунитевыми молекулами ДНК в определенных участках (сайты узнавания) и расщепляют их на фрагменты (рестрикты). Собственную ДНК они не разрушают, поскольку ее сайты узнавания модифицируются специфическими метилазами (Arber, Dussoix, 1962). Ферменты рестрикции и модификации найдены практически у всех исследованных бактерий. Они могут кодироваться также фагами и плазмидами.

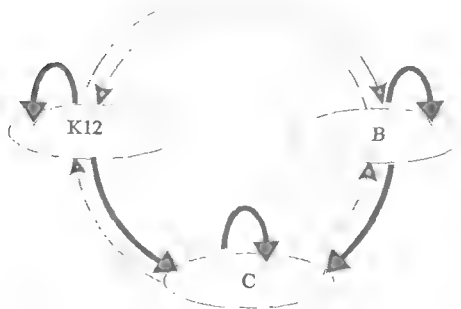


Рис. 5.9. Схема явления рестрикции и модификации на примере развития фагов в клетках *E. coli* (штаммы К-12, В и С). Штаммы К-12 и В обладают разными РМ-системами, штамм С не имеет этой системы. Жирная стрелка означает, что эффективность титрования фага равна 1; тонкая стрелка указывает на существенное ограничение развития фага эффективностью равной 1 (см. рис. 5.9). Некоторые фаги и плазмиды обладают специальными антирестрикционными механизмами. Например, они могут: 1) иметь специальный белок, который ингибирует действие хозяйской рестриктазы; 2) кодировать метилазу с той же специфичностью, как и хозяйская метилаза; 3) включать в свою ДНК необычные нуклеотиды, не узнаваемые рестриктазами; 4) иметь небольшое число сайтов рестрикции и др. Отметим также, что однопонтевая ДНК редко атакуется рестриктазами (см. гл. 6). Поэтому фаги с однопонтевой ДНК и плазмидная ДНК в процессе конъюгации определенное время не доступны для них.

Проблема репликации. Стабильное наследование чужДНК, избежавшей гидролиза рестриктазами, маловероятно. Для этого чужДНК должна быть или стать репликоном, или интегрироваться в хозяйскую хромосому. Сошлемся на пример плазмид с широким кругом хозяев (см. гл. 3) и случай репликации стафилококковой плазмиды в *S. cerevisiae* (Goursot *et al.*, 1982). Конечно, теоретически также возможно, что чужДНК приобретет *ori*-сайт реципиентной клетки.

Проблема рекомбинации. При рекомбинационном закреплении чужДНК возникает новый барьер — проблема коррекции неспарен-

У чужДНК есть несколько возможностей избежать гидролиза рестриктазами. Рестриктазы и метилазы конкурируют между собой, но расщепляющая активность превышает метилирующую в среднем на два порядка. Так, если какая-либо фаговая ДНК имеет только один сайт узнавания для клеточной рестриктазы, то эффективность титрования фага на этих клетках (в предположении, что сайт исходно не метилирован) составит 10^{-2} , если два сайта, то — 10^{-4} и т. д. Развившиеся фаги в дальнейшем титруются на этих же клетках с

ных оснований, которые появляются в гетеродуплексах в случае взаимодействия не полностью гомологичных ДНК. В участках, где находятся неспаренные основания, под действием репарирующих ферментов образуются одностранные бреши. Если соседние неспаренные основания достаточно близки, то при их одновременной репарации на разных нитях бреши могут перекрыться, что приведет к двунитевому разрыву ДНК и гибели рекомбинанта (рис. 5.10; Григорьев *и др.*, 1978). Этот механизм является серьезнейшим препятствием для межвидовых обменов генетическим материалом (Rayssiguier *et al.*, 1989).

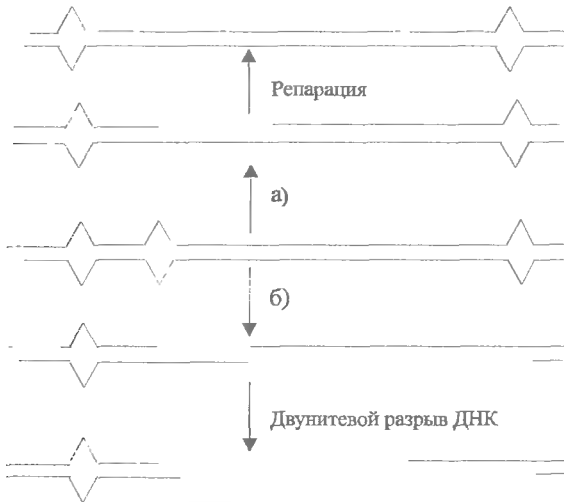


Рис. 5.10. Возможные варианты коррекции неспаренных оснований при рекомбинации не полностью гомологичных ДНК: *а* — последовательная репарация; *б* — одновременная репарация. Неспаренность оснований обозначена расхождением нитей ДНК

Проблема транскрипции. Следующее препятствие — экспрессия чужеродных генов. В подавляющем большинстве случаев — это вопрос их удачной интеграции рядом с промоторами реципиентных клеток. К настоящему времени описано только функционирование генов антибиотикоустойчивости со своими промоторами при их переносе из грамположительных бактерий в грамотрицательные.

Таблица 5.1

Наиболее используемые кодоны в разных видах клеток

Аминокислоты	Грам(-) бактерии	Грам(+) бактерии	Дрожжи	Животные	Двудольные растения	Однодольные растения
Ала	GCUG>GCA	GCA>GCU	GCUG>GCC	GCC>GCU	GCU>GCA	GCC>GCG
Арг	CGU>CGG	AGA>CGU	AGA>CGU	AGG=AGA	AGA>AGG	CGC>AGG
Асн	AAC>AAU	AAU>AAC	AAC>AAU	AAC>AAU	AAC>AAU	AAC>AAU
Асп	GAC>GAU	GAU>GAC	GAC>GAU	GAC>GAU	GAU>GAC	GAC>GAU
Вал	GUU>GUA	GUU>GUA	GUU>GUC	GUG>GUC	GUU>GUG	GUG>GUC
Гис	CAC>CAU	CAU>CAC	CAC>CAU	CAC>CAU	CAU>CAC	CAC>CAU
Гли	GGU>GGC	GGC>GGU	GGU>GGC	GGC>GGA	GGA>GGU	GGC>GGG
Глн	CAG>CAA	CAA>CAG	CAA>CAG	CAG>CAA	CAA>CAG	CAA>CAG
Глу	GAA>GAG	GAA>GAG	GAA>GAG	GAG>GAA	GAA>GAG	GAG>GAA
Иле	AUC>AUC	AUU>AUC	AUC>AUU	AUC>AUU	AUU>AUC	AUC>AUU
Лей	CUG>>CUU	UUA>CUU	UUG>UUA	CUG>CUC	UUG>CUU	CUC>CUG
Лиз	AAAG>AAGC,A	AAA>AAG	AAG>AAA	AAG>AAA	AAG>AAA	AAG>AAA
Про	CCG>CCA	CCU>CCG	CCA>CCU	CCC>CCU	CCA>CCU	CCA>CCG
Сер	UCU>UCCA	UCU>UCA	UCU>UCC	AGC>UCC	UCU>UCA	AGC>UCC
Тир	UAC>UAU	UAU>UAC	UAC>UAU	UAC>UAU	UAC>UAU	UAC>UAU
Тре	ACC>ACU	ACA>ACU	ACU>ACC	ACC>ACA	ACU>ACA	ACC>ACG=ACU
Фен	UUC>UUUG	UUU>UUC	UUU>UUC	UUC>UUU	UUC>UUU	UUU>UUU
Цис	UGC>UGU	UGC>UGU	UGU>UGC	UGC>UGU	UGC>UGU	UGC>UGU
Стоп	UAA>UGA	UAA>UGA	UAA>UGA	UGA>UAA	UGA>UAA	UGA>UAG

Примечание. Для аминокислот Ала, Арг, Гли, Иле, Лей, Про, Сер, Тре и Вал, имеющих более двух кодонов, в случае неравенства частот их использования указаны только два наиболее используемых кодона. Знак >> обозначает, что частоты использования отличаются более, чем в 10 раз. Буквы на 3'-конце кодонов указывают на предпочтительность последующих нуклеотидных остатков в генах *E. coli*.

Проблема кодонов. Из-за вырожденности генетического кода одна и та же аминокислота может кодироваться несколькими кодонами, и зачастую ей соответствуют несколько изоакцепторных тРНК. Частоты встречаемости разных тРНК в клетках различных организмов неодинаковы. Причем, как показали исследования, эти частоты положительно коррелируют с частотами использования кодонов в клетках тех же организмов (Ikemura, 1985). У многоклеточных организмов в разных тканях предпочтительными могут быть разные кодоны и тРНК. Это обстоятельство является определенным препятствием для трансляции в случае переноса генов между отдаленными видами и тем более царствами, поскольку в реципиентных клетках для некоторых кодонов чужеродного гена может не хватать тРНК. Предпочтительно используемые (оптимальные) кодоны были выявлены для клеток многих видов (табл. 5.1).

Интересно отметить, что если белки в клетках синтезируются в больших количествах, то кодирующие их гены состоят в основном из оптимальных кодонов (правило оптимальности кодонов). Таковыми являются, например, у *E. coli* гены рибосомных белков (*rpl* и *rps*), белков внешней мембраны (*ompA*), клеточной стенки (*lpp*), РНК-полимеразы (*rpoB*), фактора элонгации трансляции *Tu* (*tufA*), белка RecA и др. Напротив, если число молекул белка на клетку измеряется единицами (например, регуляторный белок, кодируемый геном *trpR*), то доля неоптимальных кодонов в нем заметно возрастает.

Геномные перестройки

Запрограммированные перестройки в ДНК вызываются сайт-специфической рекомбинацией, вследствие чего появляются детерминированные делеции, инверсии и инсерции. Они приводят к дифференцированному выражению определенных генов и даже к дифференцировке клеток. Неконтролируемые делеции, инверсии, дупликации и инсерции приводят к трудно предсказуемым последствиям. Закреплению полезных изменений в потомстве могут способствовать “эгоистические” гены.

Делеции. Хрестоматийным примером стал расшифрованный механизм дифференцировки клеток животных при формировании генов иммуноглобулинов. В этом случае внутригенные делеции позволяют формировать целый ген из различных генных

сегментов. Аналогичное явление выявлено и у бактерий. Так, у нитчатых цианобактерий *Anabaena* при азотном голодании десятая часть клеток дифференцируется в неразмножающиеся гетероцисты. В результате двух делеций в них восстанавливается целостность *nif*-оперонов, отсутствующая в обычных клетках, и гетероцисты, фиксируя атмосферный азот, начинают снабжать соединениями азота соседние клетки (Golden *et al.*, 1985). Сходный механизм функционирует у *B. subtilis* при спорообразовании (Kunkel *et al.*, 1990). Спора созревает внутри материнской клетки вокруг одного из нуклеоидов после несимметричной септации. Последовательное включение необходимых для этого генов происходит путем смены сигма-факторов РНК-полимеразы. Один из таких факторов, σ^K , кодируется расщепленным геном *sigK*. В родительской клетке происходит воссоединение частей этого гена путем делеции разделяющего их участка ДНК: неактивный *sigK* = *sigK'*-(*recombinase*)-*sigK''* → активный *sigK*. Интересно, что ген рекомбиназы, осуществляющей этот процесс, находится в делетируемом участке. В обоих приведенных примерах дифференцированные клетки потомства не дают.

Инверсии. Опишем способ регуляции внутриклеточных процессов путем обратимой инверсии небольшого генетического сегмента. У клеток *S. typhimurium* одна из субъединиц флагеллина (белок жгутика) представлена двумя типами белков, кодируемых генами *H1* и *H2*. Клетки синтезируют белки *H1* и *H2* поочередно, причем частота переключения их синтеза, определяемая по изменению антигенных детерминант, равна 10^{-5} — 10^{-3} . Выяснилось, что смена таких состояний клеток обуславливается инверсией сегмента *H*, размер которого 980 п.н. (Simon, Silverman, 1983). Он располагается перед геном *H2* и содержит промотор (рис. 5.11). Ген *H2* находится в том же опероне, что и ген *rhl*, кодирующий репрессор гена *H1*. При одном положении сегмента образуется белок *H2* и репрессор гена *H1*. Поэтому у клетки проявляется только антиген *H2*. При изменении положения этого сегмента оперон *H2-rhl* выключается, что и приводит к смене антигенной структуры клетки. Инверсия сегмента, на концах которого находятся инвертированные повторы размером в 14 п.н., осуществляется с помощью белка, ген *hin* которого располагается в самом сегменте. Аналогичная система найдена в клетках *Shigella boydii* и

S. dysenteriae с инвертазами PinB и PinD, соответственно (Tominaga *et al.*, 1991).

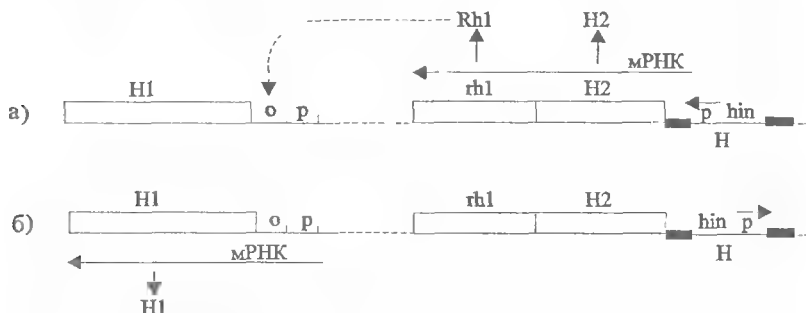


Рис. 5.11. Регуляция смены антигенной структуры с помощью инвертируемого сегмента *Hu* клеток *Salmonella*: а — ген *H2* включен, ген *H1* выключен; б — ген *H2* выключен, ген *H1* включен.

■ — инвертированные повторы сегмента *H*; p — промотор; o — оператор; штриховая стрелка указывает на сайт действия продукта гена *rh1*

Напомним, что регуляция активности генов путем инверсии генного сегмента описана также у фагов P1 и Mu, дефектного профага e14 и плазмиды p15B (см. гл. 4, рис. 4.11). Интересно отметить, что инвертазы Cin, Gin, Pin, Hin, Min, PinB и PinD гомологичны на 60 % и взаимно заменяют друг друга. Отмечено их значительное сходство с резольвазами транспозонов Tn3-семейства (см. гл. 2), но комплементация функций в данном случае отсутствует. Инвертазы и резольвазы составляют одно семейство сайт-специфических рекомбиназ. Другое семейство включает в себя интегразы лямбдоидных фагов, Cte-рекомбиназу фага P1 (см. гл. 4), FLP-рекомбиназу 2-микронной плазмиды дрожжей (см. гл. 3) и Fim-инвертазу *E. coli*, действие которой приводит к обратимому изменению структуры пилей (Abraham *et al.*, 1985).

Смена двух состояний поверхностных антигенов под управлением инвертаз Fim и Hin способствует повышению устойчивости бактерий против иммунной системы животных. Выявлены и другие механизмы, направленные на достижение этой же цели (см. обзор Borst, Greaves, 1987). У *Neisseria gonorrhoeae* вариабельность структуры пилина достигается путем присоединения к его начальной константной части одной из многих различных копий

концевой части, а разнообразие в структуре основного поверхностного антигена происходит благодаря смене рамки считывания его нескольких генов. Напомним также, что у спирохет *Borrelia* антигенная вариация обеспечивается рекомбинацией между линейными плазмидами (см. гл. 3).

Инсерции. Случаи направленных инсерций генов в плазмидные ДНК рассматривались в гл. 4. Генетические элементы — интегроны, способствующие этому, в клеточных хромосомах пока не описаны.

Неконтролируемые геномные перестройки. В предыдущих главах уже отмечалось, что с помощью плазмид и фагов можно осуществлять транспозицию генов с их собственными промоторами. Локализация гена в чужом для него окружении не отражается, как правило, на его функционировании. Отмечено лишь две причины, из-за которых уровень транскрипции может измениться в 2–3 раза. Во-первых, число транскриптов определенного гена зависит от его положения относительно бактериального *ori*-сайта: чем ближе к *ori*-сайту, тем их больше (эффект дозы гена). Во-вторых, при перемещениях генов с их инверсией следует учитывать, что эффективность транскрипции гена зависит от его ориентации относительно направления движения репликационной вилки: большинство активно транскрибируемых генов расположены в направлении их репликации. Последствия дупликации генов или делеций в большинстве случаев легко предсказуемы: возможности функции увеличиваются или теряются. К сложным последствиям приводят инверсии значительных сегментов в ДНК. Выживаемость клеток с инверсией локусов в одной трети хромосомы около района терминации репликации серьезно понижена. Возможно, это вызвано необходимостью сохранить структурно этот район из-за его предполагаемой связанности с мембраной и участия в процессе сегрегации ДНК.

Эгоистическая ДНК. Борьба за выживание — основной движитель биологической эволюции. Она происходит и на молекулярном уровне, о чем свидетельствует существование “эгоистических” генов. Под этим названием подразумевают целый класс генетических элементов или группы генов, которые, находясь в

клетке, “заботятся” прежде всего о собственном сохранении в ряду поколений. При этом они часто вступают в конфликт с организмом-хозяином. Некоторые такие явления уже описывались в книге. Наиболее яркий пример — индуцибельные профаги умеренных фагов (см. с. 110). Они могут находиться в лизогенных клетках в течение сотни генераций, не причиняя им вреда и даже в чем-то обеспечивая им преимущества по сравнению с нелизогенами. В неблагоприятных для клеток условиях профаги индуцируются, давая фаговое потомство и убивая клетки. Эгоистично и поведение плазмид, обладающих системами постсегрегационной гибели бесплазмидных клеток (см. с. 73). Здесь формой “заботы” о себе является обеспечение сохранившихся клеток питательными ресурсами, которые иначе были бы использованы бесплазмидными клетками. Эгоистические гены при мейозе у эукариот приводят к предпочтительной передаче в потомство собственных аллелей, вызывая гибель зигот, не получивших эти аллели (Beeman *et al.*, 1992).

Эгоистичными являются и системы рестрикции-модификации класса II (см. с. 164), гены которых могут находиться в геномах плазмид, фагов и даже клеток. Поддержание этих систем важно для защиты клетки от проникновения чужДНК. Оказалось, что клетки, потерявшие RM-систему, погибают, способствуя тем самым ее сохранению в популяции (Naito *et al.*, 1994). Механизм заключается в том, что метилаза, оставшаяся в клетке после потери или инактивации RM-системы, не успевает прометилировать множество сайтов на хозяйской ДНК, а рестриктазе достаточно расщепить один сайт, чтобы погубить клетку.

Иногда гибель клеток при определенных условиях программируется содержащимися в них “эгоистическими” генами. В таких случаях их альтруистическое поведение продиктовано необходимостью обеспечить выживание более “удачливых” копий. Известно, например, явление самоубийства клеток, зараженных определенным вирусом, что не позволяет ему развиваться и инфицировать соседние клетки (Vaux *et al.*, 1994; Yarmolinsky, 1995). У прокариот примером подобного типа реакции служит явление исключения фагов, программируемого резидентным профагом или плазмидой: ген *old* фага P2 исключает развитие фага λ , ген *pif* F-плазмиды — фага T7, гены *rexAB* фага λ — многих других фагов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОВТОРЕНИЯ И ОБСУЖДЕНИЯ

5.1. Почему для процесса упаковки бактериальной ДНК в нуклеоид необходимо нейтрализовать ее отрицательный заряд? Как это делается?

5.2. Каков биологический смысл того, что дифференцировавшиеся клетки (в приведенных примерах гетероцисты *Anabaena* и материнские клетки *B. subtilis*) не дают потомства?

5.3. Составьте план эксперимента по картированию нового гена *E. coli* в пределах ~10 мин карты (используйте штаммы и маркеры, см. рис. 3.10).

5.4. Составьте план эксперимента по картированию нового гена *E. coli* в пределах ~1 мин карты, считая задание 5.3 выполненным.

5.5. Почему у дрожжей в гаплоидных клетках типа a не функционируют α -специфические гены? Обратима или нет смена типов спаривания у дрожжей?

5.6. Для каких целей служат запрограммированные геномные перестройки?

5.7. Какие проблемы можно решать с помощью соматических гибридов?

5.8. Составьте план эксперимента по конструированию гибридомы с определенной специфичностью.

5.9. Охарактеризуйте природные механизмы, препятствующие межвидовым обменам генами.

5.10. В чем заключается социальная опасность работ по клонированию человека?

ЧАСТЬ II

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ IN VITRO

Для создания химер — организмов, обладающих необычными сочетаниями признаков, разработаны методы манипулирования генами *in vitro*. Основной “инструментарий” этих методов — прежде всего ферменты, действующие на ДНК, векторы — переносчики генов, а также синтетические олигонуклеотиды (линкеры, адаптеры, праймеры, зонды и т. д.), с помощью которых объединяют, синтезируют, отыскивают и анализируют гены. Многие из перечисленных препаратов имеются в готовом виде.

В стандартном генно-инженерном эксперименте *in vitro* в векторные молекулы с помощью ферментов встраивают определенные гены или фрагменты чужеродной ДНК (чужДНК). Полученные молекулярные гибриды называют рекомбинантными ДНК (рекДНК). Конструирование молекулярных химер *in vitro* включает ряд разноплановых, параллельных и/или последовательных операций, которые заканчиваются введением рекДНК в реципиентные клетки. В генно-инженерных экспериментах реципиентные клетки играют двойную роль. На первом этапе после манипуляций с молекулами ДНК *in vitro* они служат для их клонирования, т. е. для разделения смеси всевозможных продуктов реакции по отдельным клеткам и получения клонов, содержащих векторы или индивидуальные рекДНК. Именно поэтому всю процедуру называют “клонирование ДНК” или “клонирование генов”. На последующих этапах реципиентные клетки используют для амплификации клонированных генов, для получения их продуктов и т. д.

Методы клонирования генов исключительно важны для фундаментальных исследований и прикладных целей. Они носят

универсальный характер, а системы клонирования приходится разрабатывать для каждого из видов организмов индивидуально. В понятие “системы клонирования” для определенного вида входят набор векторов, способных реплицироваться в клетках данного организма, подходящие реципиентные клетки, а также способы переноса в них векторов и рекДНК.

Из современных пособий по лабораторной генно-инженерной практике отметим прежде всего четырехтомное издание “Genome analysis” (1997–1998): т. 1 — “Анализ ДНК”, т. 2 — “Определение генов”, т. 3 — “Системы клонирования”, т. 4 — “Картирование геномов”. Ряд новых методов описан в “Gene cloning and analysis: Current innovation” (1997). Некоторые из этих методов в действии живо и интересно изложены в лекциях, прочитанных Е.Д. Свердловым в МГУ им. М.В. Ломоносова (Свердлов, 1995–1998).

Глава 6

ФЕРМЕНТЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

К наиболее важным ферментам, применяющимся в генетической инженерии, относятся специфические эндонуклеазы — рестриктазы, с помощью которых получают фрагменты ДНК воспроизводимого состава и длины, а также ДНК-лигазы, объединяющие эти фрагменты. Широко применяются также различные ДНК-полимеразы, ведущие матричный синтез ДНК. Среди них уникальный фермент — обратная транскриптаза, которая синтезирует копии генов, используя в качестве матрицы их мРНК.

Ферменты рестрикции и модификации

Рестриктазы. О явлении рестрикции и модификации у бактерий уже упоминалось в гл. 5. В частности подчеркивалось, что специальные ферменты — рестриктазы — узнают в ДНК определенные специфические для каждого фермента последовательности нуклеотидов и расщепляют ее, если она не модифицирована в этих же участках сайт-специфическими метилазами. Уже описано около 2500 рестриктаз, выделенных из разных микроорганизмов.

Рестриктазы и метилазы обозначаются буквами R и M. Название фермента складывается из первой буквы рода бактерий и двух первых букв вида, например *Bacillus subtilis* — *Bsu*, *Escherichia coli* — *Eco*. При необходимости дается типовая характеристика штамма: к примеру, *Hinc* обозначает фермент из клеток *Haemophilus influenzae* с серотипом с. Если в определенном штамме клеток имеется несколько систем рестрикции и модификации (RM-систем), то вводится дополнительно числовое обозначение. Так, названия *HaeI*, *HaeII* и *HaeIII* относятся к трем разным ферментам клеток *Haemophilus aegyptius*. Белки RM-систем могут кодироваться плазмидами и фагами, и тогда к названию фермента добавляется

название внехромосомного элемента. Например, название *EcoP1* относится к ферменту, кодируемому фагом P1.

С учетом основных свойств RM-систем (субъединичность строения, потребность в кофакторах, специфичность сайтов расщепления и их положение относительно сайтов узнавания) их подразделяют на четыре класса. Потребность в ионах Mg^{2+} характерна для всех рестриктаз, а для работы ферментов классов I, III и IV, кроме того, обязательно присутствие в среде АТФ и S-аденозилметионина.

Рестриктазы класса I расщепляют ДНК в произвольных местах на расстоянии от нескольких сот до нескольких тысяч пар нуклеотидов от сайтов узнавания, образуя при этом сплошной спектр рестриктов. Поэтому эти рестриктазы в генетической инженерии практически не используют, так как с их помощью нельзя получить фрагменты ДНК, строго детерминированные по размерам и содержанию информации. Тем не менее, знакомство с RM-системами штаммов *E. coli*, относящимися к классу I, необходимо ввиду того, что именно в этих клетках (главным образом штамма K-12) ведут тестирование чужДНК. Их рестриктазы и метилазы объединены в один комплекс с белком S, обеспечивающим связь всего комплекса с сайтом узнавания, если сайт не метилирован. Как и все сайты узнавания ферментов этого класса, *EcoK*-сайт несимметричен:



(краткая запись — 5'-AACN₆GTGC-3').

Какие факторы предопределяют место расщепления ДНК R-субъединицей, остается пока неясным, но известно, что в процессе гидролиза комплекс R_2M_2S остается связанным с сайтом узнавания. Субъединицы комплекса кодируются генами *hsdR*, *hsdM* и *hsdS*. С целью предотвращения деградации чужДНК ее вводят, как правило, только в клетки, мутантные по гену *hsdR*.

У рестриктаз класса II сайты расщепления совпадают с сайтами узнавания или находятся рядом с ними на строго определенном расстоянии, что позволяет получать рестрикты определенной длины. Кроме того, рестриктазы и метилазы этого класса действуют независимо, что весьма удобно в экспериментальном плане. Поэтому они широко применяются для генетического конструирования *in vitro*, выделения генов, их физического картиро-

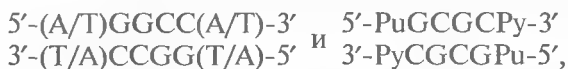
вания с целью определения последовательности нуклеотидов в ДНК и т. д. Первым описанным ферментом этого класса была рестриктаза *HindII* (Kelly, Smith, 1970; Smith, Wilcox, 1970).

Молекулярная масса рестриктаз класса II достигает нескольких десятков килодалтон. Рестриктазы (и метилазы) этого класса ферментов действуют как отдельные белки. Расщепляя двунитевую ДНК, они образуют, как правило, 5'- и 3'-ОН-концы. Самые важные характеристики этих рестриктаз — структура их сайтов узнавания и способ расщепления ДНК. По этим признакам их можно разделить на несколько подклассов.

Более половины всех рестриктаз относится к подклассу *IP*, который представлен ферментами, узнающими тетра-, гекса- и октануклеотидные последовательности с вращательной симметрией второго порядка (подобные структуры называют палиндромными). Рестриктазы этого подкласса действуют либо на определенные сайты, например,



либо на сайты, в которых присутствуют альтернативные основания, занимающие симметричные позиции. Например, по четыре сайта узнавания имеют рестриктазы *HaeI* и *HaeII*:



соответственно. Здесь и далее Pu — пурин, Py — пиримидин.

Рестриктазы подкласса *IIW* узнают пента- и гептануклеотидные палиндромы, в центре которых находится один из двух альтернативных нуклеотидов или любой нуклеотид (N). Фланкирующие нуклеотиды, стоящие в симметричных положениях, также могут быть альтернативными:



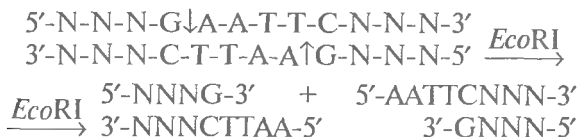
Рестриктазы подкласса *IIN* узнают палиндромы, прерываемые несколькими произвольными нуклеотидами. Примером является *SfiI*-сайт:



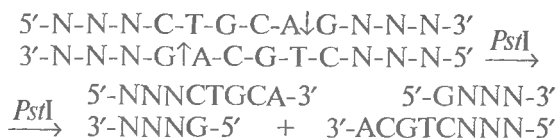
Рестриктазы подклассов IIS и IIT узнают непалиндромные последовательности, состоящие из 4–6 и более пар нуклеотидов. Подклассы отличаются тем, что в первом случае рестриктазы расщепляют ДНК на определенном расстоянии от сайта узнавания (от 1 до 20 п.н.), а во втором случае — в самом сайте. Примеры таких последовательностей для подкласса IIS — *MnII*-сайт 5'-CCTCN₇-3', а для подкласса IIT — *SgrAI*-сайт 5'-CAG↓CCGGTCG-3'.

При случайном распределении нуклеотидов в ДНК участки, состоящие из *n* определенных нуклеотидов, встречаются в среднем через 4ⁿ нуклеотидных остатков. Поэтому число сайтов узнавания, приходящихся на один геном или ген известной длины, в какой-то степени можно прогнозировать. Более точный прогноз можно сделать, оценив в сайте узнавания и в изучаемой ДНК содержание АТ- и ГС-пар.

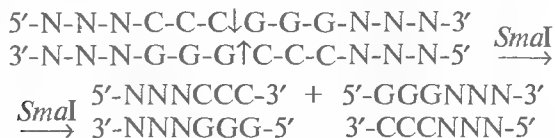
По способу расщепления ДНК рестриктазы класса II распадаются на два типа. Одни осуществляют ступенчатый разрез нитей ДНК (положения гидролизуемых связей на разных нитях не совпадают), а другие — прямой (расщепляются совпадающие связи). В результате у фрагментов ДНК образуются, соответственно, выступающие односторонние или ровные (тупые) концы. Конечно, в местах разрезов (↓,↑) выступающие последовательности нуклеотидов, относящиеся к разным нитям ДНК, являются комплементарными (липкими). В случае действия рестриктаз подкласса IIR, узнающих палиндромные сайты, все рестрикты обладают липкими концами. Пример этого типа рестриктаз — эндонуклеаза *EcoRI*, образующая 5'-выступающие концы:



Выступать могут и 3'-концы как, например, при действии рестриктазы *PstI*:



Пример действия рестриктаз второго типа:



В приведенных примерах сайты расщепления совпадают с сайтами узнавания. Такие сайты называют еще сайтами рестрикции. Когда они представлены палиндромами, то на разных нитях ДНК гидролизуются связи, расположенные либо симметрично относительно центра палиндрома, либо в самом центре. Это позволяет предыдущие примеры записать в краткой форме: 5'-G↓AATTC-3', 5'-CTGCA↓G-3' и 5'-CCC↓GGG-3', причем знаки 5' и 3' могут опускаться. Знак “↓” указывает на положение гидролизуемых связей, которое определяет число нуклеотидных звеньев в выступающих концах. Примеры возможных вариантов строения концов у фрагментов рестрицированной ДНК представлены в табл. 6.1.

Для рестриктаз, узнающих непалиндромные последовательности нуклеотидов и расщепляющих ДНК в стороне от сайтов узнавания, в кратких записях указывают в скобках для каждой нити расстояния от них до гидролизуемых связей. Например, рестриктазу *HgaI* характеризует запись GACGC(5/10). Она расщифровывается следующим образом:



Многие рестриктазы, даже выделенные из бактерий, относящихся к разным семействам, узнают на ДНК одинаковые сайты. Такие рестриктазы называют изомерами. Они подразделяются на изошизомеры и гетерошизомеры. Первые не только узнают одинаковые сайты, но и одинаково их расщепляют, а вторые эти сайты расщепляют по-разному. Примеры изошизомеров представлены в табл. 6.1. Гетерошизомерами являются, например, рестриктазы *Asp718I* (5'-G↓GTACC-3') и *KpnI* (5'-GGTAC↓C-3'). Некоторые рестриктазы характеризуются большим числом изомеров.

Так, для *Bam*HI найдено 20 изомеров, из них четыре изошизомера; у *Pst*I описано 42 изомера, из них девять изошизомеров и т. д.

Таблица 6.1

Структура концов ДНК, образующихся при действии рестриктаз в пределах сайтов узнавания

Рестриктазы	Сайты узнавания	Выступающий конец	Число звеньев
n = 4			
<i>Fnu</i> CI, <i>Mbo</i> I, <i>Sau</i> 3AI	↓GATC	5'	4
<i>Hap</i> II, <i>Hpa</i> II, <i>Mno</i> I	C↓CG	5'	2
<i>Bsp</i> RI, <i>Bsu</i> RI, <i>Cli</i> I, <i>Fnu</i> DI, <i>Hae</i> III, <i>Sfa</i> I	GG↓CC	Нет	0
<i>Hha</i> I, <i>Fnu</i> DIII	GCG↓C	3'	2
<i>Nla</i> III	CATG↓	3'	4
n = 5			
<i>Eco</i> RII	↓CC(A/T)GG	5'	5
<i>Asu</i> I, <i>Sau</i> 96I	G↓GNCC	5'	3
<i>Apy</i> I, <i>Aor</i> I, <i>Bst</i> NI, <i>Tag</i> XI	CC↓(A/T)GG	5'	1
<i>Bcn</i> I	CC(C/G)↓GG	3'	1
n = 6			
<i>Hind</i> III, <i>Hsu</i> I	A↓AGCTT	5'	4
<i>Nde</i> I	CA↓TATG	5'	2
<i>Hpa</i> I, <i>Hinc</i> II, <i>Hind</i> II	GTT↓AAC	Нет	0
<i>Sac</i> II, <i>Sst</i> II	CCGC↓GG	3'	2
<i>Pst</i> I, <i>Sal</i> PI, <i>Sfi</i> I	CTGCA↓G	3'	4

Примечание: n — число пар нуклеотидов в сайте узнавания; знаком “↓” отмечено место расщепления ДНК. Последовательность нуклеотидов указана в направлении 5'→3'.

Рестрикты, имеющие одинаковые липкие концы благодаря действию одной и той же рестриктазы или ее изошизомеров, способны объединяться друг с другом с восстановлением сайта рестрикции между ними. Но одинаковые липкие концы могут образоваться при действии на ДНК рестриктаз, узнающих различные сайты. К таким ферментам относятся, например, рестриктазы *Bam*HI (5'-G↓GATCC-3'), *Bgl*II (5'-A↓GATCT-3'),

*Bcl*I (5'-T↓GATCA-3'), *Xho*II (5'-Pu↓GATCPy-3') и *Mbo*I (5'-↓GATC-3'). Нуклеотидные остатки, образующие липкие концы, здесь подчеркнуты. Конечно, в данном случае объединяться будут любые рестрикты, но восстановленные между ними сайты будут узнаваться только рестриктазой *Mbo*I или ее изошизомером *Sau*3A.

Рестриктазы класса III сходны с рестриктазами класса I в том, что они действуют в одном комплексе с метилазами и узнают несимметричные последовательности нуклеотидов. Комплекс состоит из двух субъединиц. Способность к специфическому связыванию с ДНК присуща только метилазе, поэтому ее называют MS-субъединицей. Расщепление ДНК R-субъединицами происходит на определенном расстоянии от сайтов узнавания. Например, рестриктаза *Eco*PI характеризуется сайтом AGACC(27/25).

R M-система класса IV представлена пока уникальным ферментом *Eco*57I, в одной полипептидной цепочке которого имеются обе активности — эндонуклеазная и метилазная. Фермент характеризуется сайтом CTGAAG(16/14) (Petrusyte *et al.*, 1988).

Как и все ДНКазы, рестриктазы активны только в присутствии ионов магния. Для действия каждой из них подобраны оптимальные условия. Главные условия — определенные температура и состав буфера. Однако с целью удобства в работе (но за счет падения активности ферментов в два-три раза) состав буфера для большинства рестриктаз удалось унифицировать (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂ и 1 mM дитиотрейтол), оставив переменной величиной только ионную силу (концентрацию ионов натрия) реакционной смеси. По этому параметру ферменты разделены на четыре группы: работающие при низкой (0 mM NaCl), средней (50 mM NaCl) и при высокой (100 или 150 mM NaCl) ионной силе. Многие из рестриктаз способны работать в средах с разной ионной силой (табл. 6.2). Эти свойства ферментов необходимо учитывать при планировании экспериментов по расщеплению ДНК одновременно (или последовательно) несколькими рестриктазами. Оптимальная температура действия для большинства рестриктаз — 37 °C. Но, например, *Sma*I “предпочитает” 25 °C, а рестриктазы, выделенные из термофильных бактерий (*Bst*BI, *Tag*I и др.), эффективны при 65 °C. Последние при 37 °C сохраняют только около 10 % своей активности.

Таблица 6.2

Зависимость активности некоторых рестриктаз
от концентрации (мМ) NaCl (по данным фирмы Promega)

Рестриктаза	0	50	100	150
<i>AccI</i>	++	++	—	—
<i>AccII</i>	+	+	++	++
<i>AluI</i>	—	++	++	—
<i>AvaI</i>	++	++	++	++
<i>BaI</i>	++	+	+	—
<i>BamHI</i>	—	++	++	++
<i>Bgl</i>	—	++	++	++
<i>BglII</i>	+	++	++	++
<i>EcoRI</i>	—	++	+	++
<i>EcoRV</i>	—	—	—	++
<i>HaeIII</i>	++	++	++	++
<i>HindIII</i>	+	++	++	+
<i>HpaI</i>	—	++	++	—
<i>HpaII</i>	++	++	—	—
<i>KpnI</i>	++	—	—	—
<i>MluI</i>	+	++	++	—
<i>NcoI</i>	—	+	++	++
<i>NotI</i>	—	++	++	++
<i>PstI</i>	++	++	++	++
<i>PvuI</i>	—	+	++	++
<i>PvuII</i>	++	++	++	++
<i>SalI</i>	—	—	+	++
<i>Sau3AI</i>	++	++	++	++
<i>SmaI(a)</i>	+	+	+	+
<i>TagI(б)</i>	++	++	++	—
<i>XbaI</i>	—	++	++	++
<i>XhoI</i>	+	++	++	++
<i>XmaI</i>	++	++	++	—

Примечание: (++) , (+) и (—) означают сохранение соответственно 50, 10–50 и менее 10 % от максимальной активности фермента; (a) — необходимо добавить минимум 15 мМ KCl и инкубировать при 25–30 °C; (б) — инкубировать при 65–67 °C.

Типичный ферментативный гидролиз ДНК ведут в объеме 20 мкл, используя 0,1–1 мкг ДНК и 1 ед. фермента (количе-

ство рестриктазы, необходимое для полного расщепления 1 мкг ДНК фага λ за 1 ч при рекомендуемых условиях). Когда расщепление ДНК ведут двумя или большим количеством рестриктаз, то их добавляют одновременно при условии, если они работают в одинаковых буферах. В противном случае первым используют фермент, требующий меньшей ионной силы. По истечении заданного времени его действия ионную силу среды повышают и добавляют второй фермент. При необходимости реакцию останавливают добавлением 0,5 М ЭДТА (pH 7.5) до конечной концентрации 10 мМ.

Некоторые рестриктазы при изменении условий гидролиза (неоптимальный pH, пониженная ионная сила, повышенная на порядок концентрация фермента, присутствие органических растворителей, замена ионов магния на ионы других двухвалентных металлов) меняют свою специфичность. Например, при сдвиге pH с 7.5 до 8.3 или при отсутствии NaCl, или при замене Mg^{2+} на Mn^{2+} , или в присутствии 12—20 % глицерина эндонуклеаза *EcoRI* перестает узнавать нуклеотиды, фланкирующие сайт узнавания, и работает как эндонуклеаза *EcoRI** на сайте 5'-N↓AATTN-3'. На изменение специфичности указывает знак (*).

Отметим и другие осложнения, встречающиеся при работе с рестриктазами. Многие из них действуют на специфичные для них сайты, расположенные в разном нуклеотидном окружении, с различными скоростями. Так, *EcoRI*-сайт, расположенный на правом конце λ ДНК, расщепляется в 10 раз медленнее, а находящийся там же *SacII*-сайт — в 50 раз быстрее, чем остальные сайты. Это обстоятельство может привести к ошибке в определении числа сайтов рестрикции в данном фрагменте ДНК. Найдено также, что суперскрученные молекулы ДНК расщепляются медленнее, чем линейные. Ряд ферментов специфически расщепляют и однонитевые ДНК: *HhaI*, *HinPI* и *MnI* с эффективностью 50 %, *HaeIII* — 10 %, *BstNI*, *DdeI*, *Hinfi* и *TagI* — 1 %. Рестриктазы *AluI*, *DpnI*, *FokI*, *HpaII*, *MboI*, *Sau3A* и другие не обладают подобной активностью.

Метилазы. Следует различать сайт-специфические метилазы, сопряженные с рестриктазами, и метилазы, используемые клетками про- и эукариот для различных регуляторных целей. Молекулярный механизм действия метилаз RM-систем заключается в переносе метильных групп с S-аденозил-L-метионина на определенные

остатки цитозина (образуется 5-метилцитозин) или аденина (образуется N₆-метиладенин), расположенные симметрично на каждой нити сайта узнавания, если сайты представлены палиндромами. В результате одноименные рестриктазы перестают связываться с модифицированными сайтами и расщеплять их. Сайт узнавания устойчив к действию рестриктазы и в случае, если метилирована только одна нить ДНК. Кстати, метилаза *EcoPI*, модифицирующая центральный аденин (AGACC), вообще метилирует только одну нить. Изошизомеры не расщепляют модифицированные сайты, если сопряженные с ними метилазы метилируют основания, занимающие сходные положения. Примером служат изошизомеры *BamHI* и *BsiI*, у которых модифицированные основания (подчеркнуты) одинаковы:



Наоборот, метилазы изошизомеров *HpaII* и *MspI* модифицируют цитозины, находящиеся в разных положениях (5'-CCGG-3' и 5'-CCGG-3', соответственно), поэтому эти рестриктазы расщепляют ДНК, обработанную метилазой изомера.

Метилазы разделяют на те же классы, что и соответствующие им рестриктазы. Метилазы класса II используют обычно для модификации *in vitro* сайтов узнавания с целью защиты последних от действия одноименных рестриктаз. Кроме того, их применяют для увеличения специфичности действия рестриктаз, имеющих альтернативные сайты узнавания. Например, из четырех *AvaI*-сайтов 5'-CPyCGPuG-3' после обработки ДНК метилазой *HpaII* (5'-CCGG-3') оказывается защищенным сайт 5'-CCCGGG-3', а после действия метилазы *TaqI* (5'-TCGAA-3') защищается сайт 5'-CTCGAG-3'. Совместное действие обеих метилаз еще более увеличивает специфичность действия рестриктазы *AvaI*.

Одинаковые сайты узнавания в разных контекстах различают с помощью соседних с ними нуклеотидов, если эти сайты частично перекрываются с сайтами узнавания других RM-систем. Если, скажем, ДНК обработать метилазой *TaqI*, то из многих ее *EcoRV*-сайтов сайт 5'-GAT↓ATC-3' в последовательности 5'-TCGATATC-3' не будет расщеплен рестриктазой *EcoRV*, поскольку именно тот же нуклеотид модифицируется одноименной с ней метилазой.

У клеток *E. coli* известны две метилазы, *Dam* и *Dcm*, не связанные с *RM*-системами. Первая метилирует аденин в тетрауклетиде 5'-GATC-3', а вторая — внутренний цитозин в последовательности 5'-CC(A/T)GG-3'. Иметь представление о них необходимо, так как ДНК, выделенная из этих клеток, не расщепляется (полностью или частично) теми из рестриктаз, чьи сайты узнавания перекрываются (полностью или частично) с вышеуказанными сайтами метилирования (табл. 6.3). Например, ДНК, изолированная из *Dam*⁺ клеток, полностью устойчива к рестриктазам *MboI* и *NdeII*. Впрочем, у λ ДНК метилировано только около половины возможных сайтов, что, по-видимому, объясняется недостатком времени для ее модификации до упаковки в головки. Напомним также, что некоторые плазмиды, выделенные из *Dam*⁺, не могут трансформировать *Dam*⁻ клетки. Причина — блокирование второго раунда репликации, что является следствием возникающей после первого раунда полуметилированности плазмидных *dam*-сайтов около их *ori*-сайтов. Отметим, кстати, крайне редкое свойство рестриктазы *DpnI* и ее изошизомеров: они расщепляют только метилированную ДНК в сайте 5'-GA↓TC-3'.

Таблица 6.3

**Влияние *Dam* и *Dcm* метилирования на расщепление ДНК
различными рестриктазами**

Рестрик- таза	<i>Dam</i> ⁺ : нерасщепляемая последовательность	Рестрик- таза	<i>Dcm</i> ⁺ : нерасщепляемая последовательность
<i>AccIII</i>	<u>TCCGGATC</u>	<i>AvaII</i>	<u>GG(A/T)CC(A/T)GG</u>
<i>BclI</i>	<u>TGATCA</u>	<i>BalI</i>	<u>TGGCCAGG</u>
<i>ClaII</i>	<u>ATCGATC</u>	<i>EaeI</i>	<u>PyGGCCPuGG</u>
<i>HphI</i>	<u>GGTGATC</u>	<i>Eco47I</i>	<u>GG(A/T)CC(A/T)GG</u>
<i>MboI</i>	<u>GATC</u>	<i>EcoRII</i>	<u>CC(A/T)GG</u>
<i>MboI</i>	<u>GAAGATC</u>	<i>Sau96I</i>	<u>GGNCC(A/T)GG</u>
<i>MflI</i>	<u>GAAGATC</u>	<i>ScrFI</i>	<u>CC(A/T)GG</u>
<i>NdeII</i>	<u>GATC</u>	<i>StuI</i>	<u>AGGCCTGG</u>
<i>NruI</i>	<u>GATCGCGA</u>		
<i>TagI</i>	<u>TCGATC</u>		
<i>XbaI</i>	<u>TCTAGATC</u>		

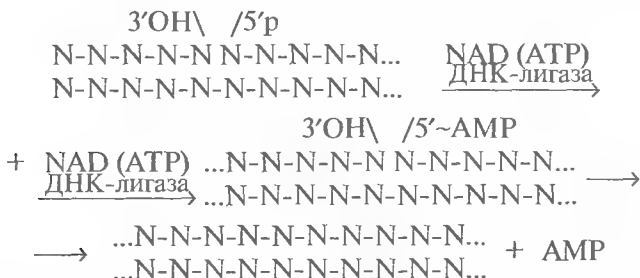
Примечание. Подчеркнуты сайты узнавания указанных рестриктаз. Шрифтом выделены метилируемые основания.

ДНК млекопитающих и высших растений часто содержит остатки 5-метилцитозина в CG-последовательностях. Такая ДНК не расщепляется теми из рестриктаз, которые имеют подобные последовательности в сайтах узнавания и чувствительны к такому характеру метилирования. К ним относятся, например, рестриктазы *HhaI* (5'-GCGC-3'), *HpaII* (5'-CCGG-3'), *SalI* (5'-GTCGAC-3') и *XhoI* (5'-CTCGAC-3'). Такие последовательности можно расщепить, используя изоизомеры с другим типом метилирования. Например, сайт 5'-CCGG-3' атакуется рестриктазой *MspI* (5'-CCGG-3').

ДНК-лигазы

Разнообразные генетические процессы (репликация, рекомбинация, репарация) сопровождаются появлением в двунитевых молекулах ДНК ников, т. е. одностебельных разрывов. В таких молекулах 3'ОН- и 5'р-концы разорванных полинуклеотидных цепей удерживаются вместе с помощью водородных связей с комплементарной нитью. Ферменты, объединяющие подобные цепи путем восстановления фосфодиэфирных связей между соседними нуклеотидами, названы ДНК-лигазами. Они являются второй по важности в генетической инженерии группой ферментов.

Наиболее изучены ДНК-лигазы клеток *E. coli* и фага Т4 с молекулярными массами, соответственно, 74 и 68 килодальтон. Энергию, необходимую для образования ковалентных связей, эти ферменты черпают у кофакторов — макроэргов NAD^+ (никотинамидадениндинуклеотид, бактериальная лигаза) или АТФ (фаговая лигаза). В обоих случаях ферменты аденилируются, а затем переносят АМР на 5'р-концы полинуклеотидных цепей в местах разрывов, что сопровождается восстановлением макроэргических пирофосфатных связей. Запасенная таким образом энергия тратится на образование фосфодиэфирных связей между соседними 3'ОН- и 5'р-концами, что приводит к “залечиванию” ников и освобождению АМР:



ДНК-лигазы ведут эту реакцию на разных субстратах, связывая даже дезоксирибо- и рибонуклеотидные цепи. Фаговая лигаза может объединить и две рибонуклеотидные цепочки, действуя как РНК-лигаза, но в отличие от последней она “работает” только на матрицах. Возможными матрицами в реакциях лигирования выступают комплементарные нити ДНК или РНК.

Лигаза фага Т4 (и бактериальная лигаза с крайне низкой скоростью) осуществляет еще одну реакцию — соединяет двунитевые фрагменты ДНК, содержащие ровные концы, образуя фосфодиэфирные связи в обеих нитях. Скорость этой реакции на два порядка ниже скорости вышеописанной реакции.

Бактериальную ДНК-лигазу используют для “сшивания” (лигирования) рестриктов, имеющих липкие концы. Оптимальная температура лигирования ДНК в никах — 37 °С, но при этой температуре энергии водородных связей между липкими концами рестриктов недостаточно для их удержания в совместном комплексе в момент реакции. Поэтому лигирование рестриктов проводят при пониженных температурах (4—12 °С). ДНК-лигаза фага Т4 незаменима в реакции объединения двунитевых фрагментов ДНК, обладающих ровными концами. Эффективность лигирования зависит от структуры объединяемых концов, даже если они оба липкие или ровные. Скорости лигирования липких концов у фрагментов ДНК плазмиды pBR322 (см. гл. 7), образованных различными рестриктазами, снижается в последовательности: *HindIII* > *PstI* > *EcoRI* > *BamHI* > *SalI*, причем *HindIII*-концы лигируются в 10—40 раз быстрее, чем *SalI*-концы. Скорости лигирования ровных концов меняются так:

HaeIII > *AluI* > *HincII* > *SmaI*, причем *HaeIII*-концы соединяются в 5—10 раз эффективнее, чем *SmaI*-концы

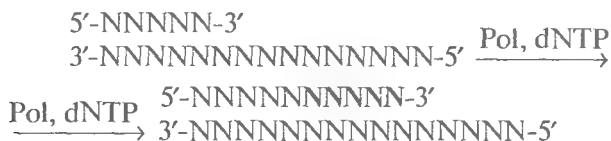
Полимеразы

Общее свойство ДНК- и РНК-полимераз — их способность вести матричный синтез нуклеиновых кислот в направлении 5'→3'. Отличие состоит в том, что ДНК-полимеразам для этой цели обязательно требуется праймер со свободной 3'ОН-группой, а РНК-полимеразы способны сами ставить на матрице первый нуклеотид. Большинство ДНК-полимераз обладают также 3'→5' экзонуклеазной (редакторской) активностью, предназначенной для удаления ошибочно присоединенных нуклеотидов.

Широкое распространение в генно-инженерной практике получили термостабильные ДНК-полимеразы. Они незаменимы в опытах с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР, см. приложение), а также для секвенирования ДНК методом высокотемпературного полимеразного копирования и с применением термоциклеров (см. гл. 9).

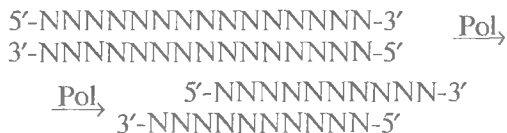
ДНК-полимераза I *E. coli*. Этот фермент состоит из одной полипептидной цепи, молекулярная масса которой 109 килодальтон. Он обладает тремя видами активности.

1. Полимеразная активность обуславливает синтез цепи ДНК в направлении 5'→3'. Он осуществляется на односторонней матрице в присутствии дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP) присоединением нуклеотидных остатков к 3'ОН-концу комплементарной нити, являющейся в таком случае праймером:

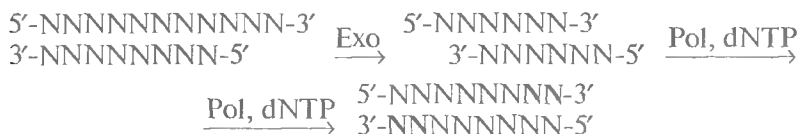


Жирным шрифтом здесь и далее в этой главе выделены вновь подставленные нуклеотиды. Процессивность данной полимеразы, т. е. ее способность подставить определенное количество нуклеотидов за один акт посадки на ДНК, невелика, всего в среднем 10—50 нуклеотидов.

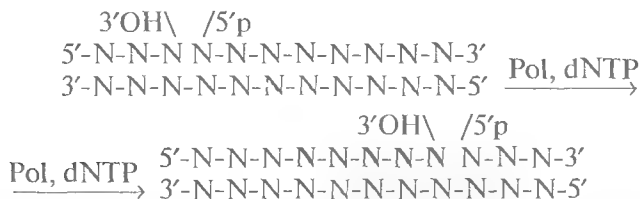
2. Экзонуклеазная активность в направлении $5' \rightarrow 3'$ вызывает отщепление нуклеотидов с $5'$ -концов двунитевых молекул ДНК и приводит к их деградации:



3. Экзонуклеазная активность в направлении $3' \rightarrow 5'$ приводит к отщеплению нуклеотидов с $3'$ ОН-концов одно- и двунитевых молекул ДНК. На двунитевой ДНК в присутствии нуклеозидтрифосфатов экзонуклеазная активность (Exo) подавляется полимеразой (Pol) активностью фермента:

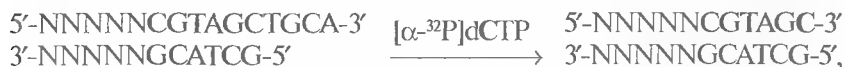


ДНК-полимераза I одновременно может вести реакцию полимеризации и гидролиз нуклеотидной цепи в направлении $5' \rightarrow 3'$, начиная с одностевого разрыва (ника) в двунитевой ДНК. При этом ник перемещается вдоль цепи ДНК (поэтому процесс назван ник-трансляцией) в направлении $5' \rightarrow 3'$ на расстояние до 1000 п.н., что используют для введения в ДНК *in vitro* меченых нуклеотидов [α - ^{32}P]dNTP:

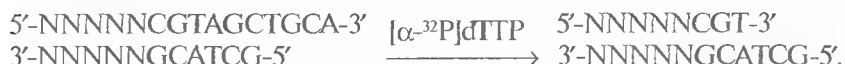


Кленовский фрагмент ДНК-полимеразы I. От ДНК-полимеразы I можно отделить с помощью трипсина или субтилизина большой (кленовский) фрагмент, который сохраняет только полимеразную и $3' \rightarrow 5'$ экзонуклеазную активности. Часть гена *polA*, кодирующая этот фрагмент, клонирована, и источником фермента служит сконструированный для этой цели продуцент.

ДНК-полимераза фага T4. Этот фермент обладает теми же активностями, что и кленовский фрагмент ДНК-полимеразы I. Однако $3' \rightarrow 5'$ экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы фага T4 существенно более эффективна, особенно на одонитевой ДНК, поэтому для введения метки в рестрикты с $3'$ -выступающими (и, конечно, ровными) концами лучше использовать эту полимеразу. Метод основан на том, что после деградации одонитевого участка фермент в присутствии определенного нуклеотида отщепляет мономерные звенья с $3'$ -концов фрагментов до тех пор, пока в двунитевой ДНК не встретится одноименный нуклеотидный остаток. После этого он замещается аналогичным нуклеотидом, присутствующим в среде. В результате образуются либо ровные концы



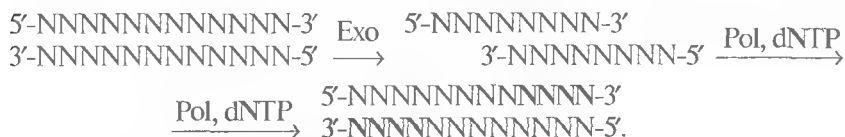
либо $5'$ -выступающие



Полимеразную активность фермента используют для введения концевой метки в ДНК, имеющую $5'$ -выступающие концы:



С помощью ДНК-полимеразы фага T4 можно вводить метку и в обширные области двунитевых фрагментов ДНК, используя последовательно ее экзонуклеазную и полимеразную активности:



Экзонуклеазная активность проявляется при отсутствии в среде нуклеотидов. Полимеразную реакцию инициируют добавляя в среду меченые dNTP.

ДНК-полимераза фага T7. Фермент обладает $5' \rightarrow 3'$ -полимеразной и $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной активностями. Он состоит из двух субъединиц: продукта гена 5 фага T7 и вспомогательного белка тиоредоксина *E. coli*. Последний повышает стабильность комплекса

фермент-матрица и увеличивает процессивность полимеразы почти в 1000 раз (до 2000—3000 нуклеотидов). Благодаря этому фермент удобен для копирования относительно длинных матриц. Для секвенирования ДНК по методу Сэнгера (см. гл. 9) используют химическую или генно-инженерную модификации полимеразы, в которых экзонуклеазная активность подавлена. Эти модификации получили название секвеназ. Они эффективно включают в ДНК дидезоксинуклеотидтрифосфаты и аналоги нуклеотидов. Скорость их работы *in vitro* при оптимальных условиях — около 320 нуклеотидов в секунду.

Taq-полимераза. Фермент получают из термофильных бактерий *Thermus aquaticus*, поэтому он сам термостабилен: реплицирует ДНК при 74 °С и сохраняет половину своей функциональной активности после прогрева при 95 °С в течение одного часа. Процессивность полимеразы превышает 7600 нуклеотидов, благодаря чему она используется так же, как секвеназа. Фермент обладает 5'→3'-экзонуклеазной активностью, но редакторская 3'→5' экзонуклеазная активность у него отсутствует. Это приводит к появлению ошибочных включений *in vitro* с частотой 10⁻⁴.

ДНК-полимеразы Vent и Deep Vent происходят, соответственно, из бактерий *Thermococcus litoralis* и *Pyrococcus species* GB-D, найденных в глубоководных термальных источниках (vent — выход, отверстие). Гены этих полимераз были клонированы, и ферменты выделяют из сконструированных для этой цели продуцентов. Полимеразы высоко термостабильны: они сохраняют половину своей функциональной активности после прогрева при 95 °С в течение 7 (Vent) и 23 (Deep Vent) часов. Ферменты обладают 3'→5' экзонуклеазной активностью, поэтому точность синтеза повышена на порядок по сравнению с Taq-полимеразой. Однако из-за этой активности они могут укорачивать праймеры, поэтому для синтеза относительно коротких фрагментов ДНК (например, при секвенировании) используют полимеразы с инактивированной экзонуклеазной активностью.

РНК-зависимая ДНК-полимераза. Биологическая роль этой полимеразы заключается в образовании ДНК-копий геномов некоторых РНК-содержащих вирусов, поэтому ее называют еще обратной транскриптазой. Обычно используют фермент, кодируе-

мый вирусом миелобласто́за птиц. Он состоит из двух полипептидных цепей, одна из которых несет экзорибонуклеазную и 5'→3' полимеразную активность. Экзорибонуклеазная активность проявляется только на дуплексах ДНК:РНК, причем цепь РНК гидролизуется путем последовательного отщепления нуклеотидов с обоих концов цепи. Как полимераз фермент работает на одонитевых молекулах РНК или ДНК, образуя комплементарные дезоксирибонуклеотидные цепи (кДНК), для чего ему требуются праймеры с 3'ОН-концом. Скорость работы этого фермента *in vitro* при оптимальных условиях низка, всего 5 нуклеотидов в секунду.

Получение *in vitro* копии структурной части гена с какой-либо мРНК ведут в две стадии: синтезируют сначала одонитевую, а затем двунитевую кДНК. На первой стадии в качестве праймера используют обычно олигонуклеотид (dT)_n, который гибридизуется с полиадениловой цепочкой на 3'-конце мРНК (рис. 6.1). Олигонуклеотид должен состоять, по крайней мере, из 12 звеньев, чтобы обеспечить стабильность дуплекса в условиях реакции (трис-буфер, рН 8.3, 46 °С). Выход одонитевой кДНК составляет лишь 5–20 % от числа молекул мРНК, причем получить копию с мРНК, длина которой превышает несколько тысяч пар нуклеотидов, крайне трудно. Для получения длинных цепей кДНК требуются 30–60-кратный молярный избыток фермента по отношению к матрице, а также высокие концентрации dNTP (до 1 мМ).

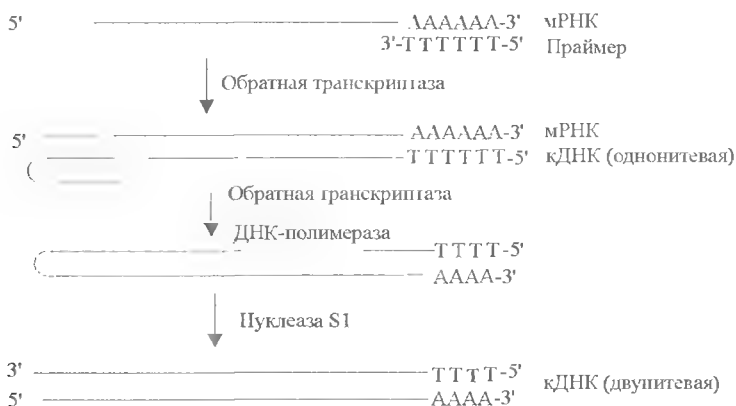


Рис. 6.1. Схема синтеза кДНК с помощью обратной транскриптазы

Во многих случаях по неясным причинам в конце первой стадии обратная транскриптаза копирует часть только что синтезированной нити кДНК. Это приводит к образованию одонитевой петли, 3'ОН-конец которой служит обычно праймером для синтеза второй нити кДНК (Higuchi *et al.*, 1976). Предварительно щелочью или рибонуклеазой H (см. с. 185) гидролизуют мРНК, а затем ведут полимеризацию обратной транскриптазой, кленовским фрагментом ДНК-полимеразы I и ДНК-полимеразой фага Т4, по отдельности или в любой комбинации, что зависит от нуклеотидного состава матрицы. Эти полимеразы при синтезе вторых нитей кДНК останавливаются в разных участках (эффект “паузирования” полимераз), так что их совместное применение позволяет увеличить длины синтезируемых нитей. На заключительном этапе с помощью нуклеазы S1 (см. с. 183) гидролизуют концевые петли и получают двунитевые кДНК. Их выход достигает 30—100 % от числа одонитевых кДНК. Конечно, из-за действия нуклеазы S1 теряется информация о строении 5'-конца мРНК. Способы сохранения этой информации описаны в гл. 9 (см. рис. 9.3).

Некоторые РНК (рибосомные или вирусные) не имеют на своих 3'-концах полиадениловых цепочек. Такие цепочки можно образовать, добавив к препаратам РНК поли(А)-полимеразу *E. coli* (см. с. 183).

С помощью обратной транскриптазы можно синтезировать копию любой части мРНК, выбрав для этого подходящий праймер. Эта возможность облегчает анализ строения какого-либо специфического участка гена. Но можно получить и набор генных фрагментов, если использовать в качестве праймеров произвольные олигонуклеотиды, получаемые, например, в результате гидролиза ДНК тимуса теленка панкреатической ДНКазой. Их разнообразие столь велико, что среди них имеются комплементарные последовательности к любому из участков мРНК (или ДНК). Добавление в реакционную смесь суммарной фракции таких праймеров дает возможность получить в наборе кДНК копии всех участков анализируемого гена. Они полезны для использования их в качестве гибридизационных зондов, применяемых для поиска определенных клонов в банках генов (см. гл. 9).

Поли(А)-полимераза. Фермент, выделенный из клеток *E. coli*, образует на 3'-ОН-конце любых однонитевых молекул РНК полиадениловые цепочки длиной до нескольких тысяч звеньев:



Он также способен добавлять к РНК полицитидиловые и полиуридилловые цепочки, но с гораздо меньшей эффективностью. Полимеразу используют для подготовки РНК в качестве матрицы при синтезе кДНК, а также для введения в РНК 3'-концевой метки.

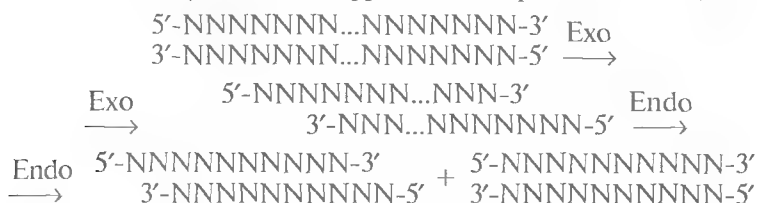
РНК-полимеразы фагов Т3, Т7 и SP6. РНК-полимеразы фагов Т3 и Т7 *E. coli* и SP6 *S. typhimurium* высокоспецифичны к промоторам собственных фагов. На фоне многих других промоторов на молекулах ДНК они узнают только “свои” и синтезируют только определенные молекулы мРНК. Это их свойство используют для приготовления меченых гибридизационных зондов и полноразмерных транскриптов для синтеза белков *in vitro*. Полимеразы обладают высокой процессивностью: выход продукта *in vitro* в оптимальных условиях составляет более 100 молекул мРНК на одну молекулу ДНК.

Нуклеазы

Нуклеаза S1. Этот фермент, выделяемый из гриба *Aspergillus oryzae*, обладает эндо- и экзонуклеазной активностями и не проявляет какой-либо специфичности к нуклеотидной последовательности ДНК. При концентрации NaCl около 0,3 М нуклеаза S1 гидролизует только однонитевые полинуклеотиды (ДНК в пять раз быстрее, чем РНК), а в двунитевых не образует даже ники. Данный фермент используют для удаления любых однонитевых структур, включая бреши (однонитевые участки в двунитевой молекуле ДНК), концы шпилек и частично денатурированные области ДНК. Он может образовывать ники в суперскрученных молекулах ДНК, атакуя “расплавленные” АТ-богатые участки. Следует учитывать, что фермент может расщеплять двунитевую ДНК напротив ника. С его помощью осуществляют картирование транскрибируемых областей геномов, обрабатывая ферментом дуплексы ДНК:мРНК (S1-mapping).

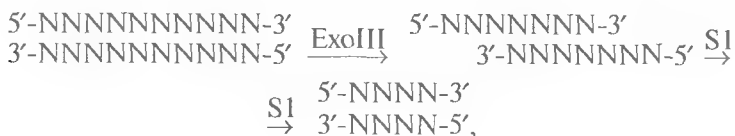
Нуклеаза из проростков золотистой фасоли (*Mung bean*). Фермент по своим свойствам похож на S1 нуклеазу с тем положительным отличием, что он не расщепляет ДНК напротив ника.

Нуклеаза Bal31. Фермент выделяют из псевдомонады *Alteromonas espejiana* Bal31. Он обладает эндонуклеазной активностью (Endo) по отношению к однонитевой ДНК, а также 3'-экзонуклеазной активностью на двунитевой ДНК, благодаря чему катализирует отщепление небольших олиго- или мононуклеотидов с обоих концов молекул. Субстрат для экзонуклеазной активности фермента — двунитевые фрагменты ДНК как с ровными, так и с выступающими концами. Изменением условий можно почти уравнивать скорости гидролиза обеих нитей с обоих концов ДНК, так что среди укороченных продуктов реакции 80—90 % составляют фрагменты с короткими 5'-выступающими концами (около пяти нуклеозидных остатков) и 10—20 % фрагментов с ровными концами:



Это позволяет применять данную нуклеазу для укорочения двунитевых фрагментов ДНК на заданную величину и для картирования сайтов рестрикции (см. гл. 8). Активность фермента регулируется изменением температуры и концентрации NaCl и полностью зависит от присутствия кальция, поэтому останавливают действие фермента добавлением ЭДТА. Нуклеаза способна делать ник в двунитевой молекуле ДНК против ника, имеющегося в комплементарной нити.

Экзонуклеаза III *E. coli*. Фермент катализирует последовательное удаление 5'-р-мононуклеотидов с 3'ОН-концов двунитевых ДНК. В сочетании с нуклеазой S1 он применяется для укорочения фрагментов ДНК:



а в сочетании с ДНК-полимеразой его используют для введения в ДНК радиоактивной метки. Фермент удаляет нуклеотиды с 3'ОН-концов даже в никах, образуя при этом бреши, но не гидролизует одонитевую ДНК и 3'-выступающие концы, содержащие, как минимум, четыре нуклеотида.

Экзонуклеаза III обладает также 3'-фосфатазной активностью на одно- или двунитевых ДНК, имеющих 3'-концы, и катализирует реакцию 3'p→3'ОН. Кроме того, на дуплексах ДНК:РНК она действует как рибонуклеаза H (см. ниже).

Экзонуклеаза фага λ. Фермент атакует преимущественно двунитевую ДНК и отщепляет 5'-нуклеозидмонофосфаты от 5'-концов цепи. Его используют для получения одонитевых выступающих 3'ОН-концов, последовательно удаляя нуклеотидные остатки с 5'-концов комплементарных нитей:



Дезоксирибонуклеаза I (панкреатическая ДНКаза). Фермент обладает эндонуклеазной активностью по отношению к одно- и двунитевой ДНК. Это позволяет с его помощью гидролизовать до моно- и олигонуклеотидов любые препараты ДНК. В присутствии ионов магния ДНКаза атакует каждую нить ДНК независимо, поэтому разрывы ковалентных связей распределяются по нитям случайным образом. В присутствии ионов марганца фермент расщепляет обе нити ДНК приблизительно в одном сайте, что приводит к образованию фрагментов ДНК, у которых концы нитей ровные или выступающие на один—два нуклеотида.

Рибонуклеаза H. Этот фермент, выделяемый из клеток *E. coli*, является эндорибонуклеазой, расщепляющей РНК в дуплексах ДНК:РНК. В результате образуются одонитевая ДНК и олигорибонуклеотиды. Двунитевые ДНК и РНК он не гидролизует.

Другие ферменты

Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза. Терминальная трансфераза (добывается из тимуса телят) способна наращивать на концах фрагментов ДНК одонитевые участки путем последовательного присоединения к 3'ОН-концам обеих нитей нуклеотидных остатков из тех дезоксинуклеозидтрифосфатов, которые

добавляются в реакционную смесь. Наиболее эффективно терминальная трансфераза удлиняет выступающие однонитевые 3'-ОН-концы, сформировавшиеся, например, при действии соответствующих рестриктаз или после предварительной обработки ДНК экзонуклеазой фага λ . Однако наращивание однонитевых 3'-концов возможно и на фрагментах ДНК с ровными концами и даже с однонитевыми 5'-концами. Для этого создают условия, дестабилизирующие вторичную структуру ДНК (низкая ионная сила, замена ионов Mg^{2+} на Co^{2+}), что способствует расплетению нитей на концах фрагментов и действию фермента. Таким образом, реакция протекает даже на фрагментах, образованных физическими методами дробления ДНК.

Терминальную трансферазу используют для создания на соединяемых фрагментах ДНК искусственных липких концов, например, олиго(dA) и олиго(dT). Этот фермент способен синтезировать гомополимеры длиной до нескольких сотен нуклеотидных остатков. Однако для эффективного объединения фрагментов к каждому из их концов добавляют не более 10–40 остатков. Длина образующихся на концах фрагментов ДНК гомополимеров контролируется изменением условий реакции.

Субстратом для терминальной трансферазы являются также однонитевые разрывы в ДНК. Поэтому препараты ее не должны содержать эндонуклеазы.

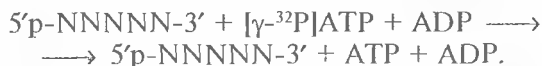
Щелочные фосфатазы. Фосфатазы обладают широкой специфичностью: они гидролизуют самые различные эфиры фосфорной кислоты. В генетической инженерии используют щелочную фосфатазу из клеток *E. coli* и из кишечника телят; первая термостабильна, а вторая инактивируется при 68 °C. Эти ферменты применяют для дефосфорилирования одно- и двунитевых молекул ДНК или РНК на 5'-р- и 3'-р-концах. В однонитевых разрывах ДНК или на концах фрагментов, где фосфатная группа (например, 5'-р) маскируется однонитевым 3'-ОН-концом комплементарной цепи, реакция идет с трудом. Повышение температуры реакционной среды дестабилизирует двунитевую структуру и устраняет отмеченный недостаток.

Полинуклеотидкиназа фага T4. Фермент способен переносить γ -фосфат с АТР на дефосфорилированные (обычно с помощью

щелочной фосфатазы) 5'-концы. Это его свойство используют для введения радиоактивной метки в 5'-концы одно- или двуниевых молекул ДНК или РНК:



Если в среде присутствует избыток ADP, то в этих условиях полинуклеотидкиназа способна замещать концевой 5'-фосфат на γ -фосфат АТФ, при этом надобность в фосфатазе отпадает:



ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОВТОРЕНИЯ И ОБСУЖДЕНИЯ

6.1. Рестриктазы *Bam*HI, *Bgl*II, *Bcl*II, *Xho*II и *Sau*3A образуют при гидролизе ДНК одинаковые липкие концы, что позволяет лигировать любые пары образованных ими рестриктоов. Какая доля образующихся гибридных сайтов в каждом из вариантов может быть разрезана рестриктазой *Bam*HI, рестриктазой *Xho*II?

6.2. Можно ли менять специфичность действия рестриктаз?

6.3. В каких случаях при лигировании смеси всех рестриктоов, полученных действием одной рестриктазы, удастся восстановить исходную структуру ДНК?

6.4. Как вводится радиоактивная метка в 5'-конец фрагмента ДНК, в 3'-конец? Рассмотрите реакции одонитевой и двунитевой ДНК. Можно ли ввести метку только в один конец дуплекса?

6.5. Какова область применения ДНК-полимеразы I и ее кленовского фрагмента?

6.6. Как решается проблема синтеза полноразмерной кДНК?

6.7. Большинство рестриктаз не расщепляют одонитевую ДНК. Было найдено, что одна из них, тем не менее, ведет такую реакцию на определенной ДНК. Чем этот эффект может быть объяснен?

6.8. Некая плазмида, выделенная из клеток *E. coli*, содержит сайты действия рестриктазы *Mbo*I, но не расщепляется ею. В чем может быть причина?

6.9. Почему реакцию лигирования ведут при пониженных температурах?

6.10. Какие условия в эксперименте определяют включение полимеразной или экзонуклеазной активностей ДНК-полимераз?

Глава 7

ВЕКТОРЫ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ В БАКТЕРИЯХ

Вектором (от лат. *vector* — переносчик, носитель) в генетической инженерии называют молекулу ДНК, способную самостоятельно реплицироваться, включать чужДНК, переносить ее в реципиентные клетки и стабильно там поддерживать. Векторы используют для создания *in vitro* молекул рекДНК и для последующего введения их в клетки, в результате чего индивидуальные молекулы из исходной смеси рекДНК разделяются по отдельным клонам и в составе последних умножают (клонировуют) число чужеродных генов. В этом смысле любой вектор является клонирующим. Векторы также значительно облегчают процедуры по выделению клонированной ДНК из клеток. Подлежащий переносу генетический материал вводится в состав вектора с помощью различных ферментов (рестриктазы, ДНК-лигазы). Первые векторы были созданы для работы с клетками кишечной палочки (Lobban, Kaiser, 1973; Cohen *et al.*, 1973). Репликация векторов зависит от клеточных белков, поэтому для каждого вида реципиентных клеток необходимо конструировать свои векторы.

Наиболее подходящие кандидаты на роль векторов — естественные репликоны небольших размеров: ДНК плазмид и вирусов (в том числе и фагов), но непосредственно в этом качестве их используют редко. Обычно их предварительно модифицируют или комбинируют их части для того, чтобы они отвечали определенным требованиям. Самые распространенные плазмидные векторы клеток *E. coli* — плазида pBR322 и ее специализированные производные. Для этих же клеток сконструированы фаговые векторы на основе ДНК фага λ и нитевидных фагов. Разработаны векторы (космиды), позволяющие отбирать рекДНК путем их упаковки *in vitro* в головки фага λ . Создаются векторы

и для промышленных микроорганизмов — бактерий (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* и т.д.) и низших грибов (*Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Neurospora* и т.д.). Интенсивно идет работа по конструированию новых векторов для переноса генов в растительные и животные клетки.

Напомним, что любая система клонирования состоит из двух взаимно связанных компонентов — векторов и реципиентных клеток, а также из методов переноса первых во вторые. Плазмидные векторы вводят в реципиентные клетки трансформацией — кальциевым методом или электропорацией, а фаговые — инфицированием или трансфекцией. Штаммы *E. coli* K-12, наиболее часто используемые в качестве реципиентных клеток, перечислены в табл. 7.1. Характерная особенность этих клеток — наличие у них мутаций *hsdR* или *hsdS*, предохраняющих клонируемые фрагменты от действия рестриктазы *EcoK*.

Таблица 7.1

Штаммы *E. coli* K-12, используемые для генно-инженерных манипуляций

Штамм	Генотип	Комментарий
BL21 (DE3)	<i>hsdS gal</i> (λ Clis857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1</i>)	Содержит ген РНК-полимеразы T7. Экспрессия генов, поставленных под промотор pT7. Высокий уровень трансформации.
DH5	<i>hsdR17 endA1 recA1 gyrA96 supE44 relA1 thi-1</i>	Высокий уровень трансформации.
DH5 α	<i>hsdR17 endA1 recA1 gyrA96 supE44 relA1 thi-1 ΔlacU169 (ϕ80dlacZΔM15)</i>	Осуществляет α -комплементацию при работе с векторами pUC.
DH10B	<i>mcrA Δ(<i>mrr</i>, <i>hsdRMS</i>, <i>mcrBC</i>) Δlac74 deoR ϕ80dlacZΔM15 <i>recA1 araD139 galU galK Δ(<i>ara</i>, <i>leu</i>)7679 λ <i>prfL endA1 nupG</i></i></i>	ВАС-клонирование, высокая частота электропорации клеток фрагментами ДНК до 300 т.п.н. Осуществляет α -комплементацию.
HB101	<i>hsdS20 recA13 supE44 ara-14 proA2 lacY1galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	R-M ⁻ для систем <i>EcoK</i> и <i>EcoB</i> . Высокий уровень трансформации.
JC7623	<i>recB21 recC22 sbcB15</i>	Клонирование протяженных инвертированных повторов.
JM103	<i>hsdR4 Δ(<i>lac -pro</i>)/F'<i>traD36 proAB⁺ lacI^q ΔM15</i></i>	Клонирование векторов серии M13mp.

Окончание табл. 7.1

Штамм	Генотип	Комментарий
K802	<i>supE hsdR gal metB</i>	Манипуляции с λ векторами.
LE392	<i>hsdR514 supE44 supF58 galK2 galT22 metB trpR55 lacY1</i>	Клонирование космид и λ векторов.
MZ-1	<i>galK Δ8(λ attLΔB amN₇N₅₃ cIts857 ΔH1) his ilv bio N⁺</i>	Экспрессия клонируемых генов с промотора λ pL.
NM538	<i>supF hsdR trpR lacY</i>	Манипуляции с λ векторами.
NM539	<i>supF hsdR trpR lacY (P2cox)</i>	Отбор λ рекДНК по Spi ⁻ -фенотипу.
SK2881	<i>hsdR 4 recA1 endA sbcB15</i>	Высокий уровень трансформации.
SMR10*	<i>(λcos2 ΔB xis1 red3 gamam210 cIts857 nin5 Sam7)λ^R</i>	Упаковка λ ДНК <i>in vitro</i> .
XS101	<i>recA1 hsdR rpoB331/F'[kan]</i>	Манипуляции с фагмидами.
XS127	<i>gyrA thi rpoB331 Δ(lac - pro)/F' traD36 proAB⁺ lacI^q ΔM15</i>	Манипуляции с фагмидами и α -комплементация.

* Штамм *E. coli* C.

В этой главе описываются только прокариотические векторы общего назначения, позволяющие проводить клонирование чужДНК. Однако, как правило, клонирование ДНК осуществляют с какой-то определенной целью (экспрессия генов, секреция белков, инсерционный мутагенез, поиск промоторов, поиск терминаторов транскрипции и т.п.) и для ее достижения обычно применяют специализированные векторы. Эти векторы, а также векторы, предназначенные для работы с эукариотическими клетками, по мере необходимости будут рассмотрены в последующих главах.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЕКТОРОВ

Классификация. Ее можно провести по разным признакам. По области использования различают: 1) векторы общего назначения (клонирование геномных генов, кДНК, любых фрагментов ДНК), 2) векторы для экспрессии клонированных генов (синтез мРНК и белков) и 3) специализированные векторы (секвенирование и мутирование генов, изучение особенностей регуляции клонированных генов, идентификация в клонируемой ДНК про-

моторов и других регуляторных сайтов). По про с х о ж д е н и ю ДНК векторы делят на: 1) плазмидные (существуют в клетке и вне ее только в виде молекул ДНК), 2) фаговые (существуют в виде молекул ДНК и вирионов) и 3) гибридные (сочетают отдельные свойства плазмид и фагов). По структуре ДНК различают кольцевые и линейные векторы. По способу поддержания в клетке выделяют: 1) автономные (реплицируются самостоятельно) и 2) интегративные (реплицируются в составе клеточной хромосомы) векторы. По числу молекул в клетке векторы могут быть: 1) малокопийными (несколько копий) и 2) мультикопийными (десятки копий). По числу репликаторов, имеющихся в векторном геноме, векторы делят на: 1) моно- и 2) бирепликонные (бирепликонные векторы называют также челночными, если они могут реплицироваться в клетках различных видов).

Основные свойства. Для эффективного выполнения своей функции вектор должен отвечать определенным требованиям: 1) быть репликоном, чтобы стабильно существовать в клетке; 2) иметь селективный маркер, позволяющий отбирать трансформированные вектором клетки; 3) иметь, по крайней мере, один единичный сайт рестрикции для внедрения в него чужДНК (подобные сайты будем в дальнейшем называть сайтами клонирования). Эти требования, конечно, не жесткие. Например, *ori*-сайты могут отсутствовать в интегративных векторах, а селективные маркеры — в фаговых.

Дополнительные свойства. Они определяются целью клонирования генов. Поэтому большинство векторов носит специализированный характер, т. е. их приспособляют для решения узкого круга задач. Например, векторы, предназначенные для экспрессии генов, содержат около сайтов клонирования мощные промоторы, причем экспрессия может быть регулируемой или нерегулируемой (конститутивной). Присутствие в таких векторах специальных сигнальных последовательностей обеспечивает секрецию продуктов клонируемых генов. Малокопийные векторы позволяют изучать, например, механизмы регуляции клонируемых генов, а мультикопийные способны умножать (амплифицировать) их число в сотни и тысячи раз. Разработаны векторы для секвенирования нуклеотидных последовательностей и для поиска в них определенных регуляторных сигналов — промоторов, терминаторов транскрипции,

антитерминаторов и т. д. Векторы прямой селекции позволяют выживать только таким трансформантам, которые содержат рекДНК. Сконструированы векторы, имеющие широкий круг клеток-реципиентов. Имеются челночные векторы, способные реплицироваться в клетках, относящихся даже к разным царствам. Векторы, как правило, создают такими, чтобы они могли нарабатываться в препаративных количествах. Это достигается использованием при их конструировании репликаторов мультикопийных плазмид или фагов с высокой продуктивностью (фаг λ и нитевидные фаги), позволяющих получать от нескольких десятков до тысячи векторных молекул на клетку. Важно также предусмотреть в конструкции вектора возможность легкого вычленения (“вырезания”) клонируемых генов.

Плазмиды или фаги? Выбор вектора — плазмидного или фагового — определяется целью клонирования и условиями генно-инженерного эксперимента.

Размер плазмидных векторов, как правило, невелик — несколько тысяч пар нуклеотидов. Преимущества плазмид небольшого размера: 1) их карты рестрикции относительно просты, что увеличивает вероятность наличия в них единичных сайтов узнавания для конкретных рестриктаз и значительно облегчает составление подобных карт у клонируемых фрагментов; 2) такие молекулы ДНК более устойчивы к повреждениям при манипулировании ими *in vitro*; 3) они, как правило, мультикопийны; 4) имеется бóльшая вероятность обнаружения рекДНК с помощью радиоактивных зондов в процедуре скрининга методом гибридизации (см. гл. 9), поскольку с повышением размера плазмид уменьшается их копияность, что ослабляет сигнал детекции. По этим причинам плазмидные векторы используют для клонирования небольших фрагментов ДНК (размер рекДНК обычно не превышает 10—15 т.п.н.).

Однако с уменьшением длины векторных молекул снижается число уникальных сайтов, используемых для клонирования генов. С целью устранения этого дефекта в плазмиды вводят полилинкеры, т. е. синтетические олигонуклеотиды, содержащие до десятка и более различных сайтов клонирования (их обозначают MCS — multiple cloning sites). Эти сайты могут быть использованы каждый по отдельности или в любой комбинации, давая возможность

интегрировать фрагменты чужДНК, полученные с помощью разных рестриктаз, в заданной ориентации. Более того, такие фрагменты можно “вырезать” по соседним сайтам, что увеличивает возможности манипулирования генами и их физического картирования (см. гл. 8).

В ряде случаев предпочтительнее использовать фаговые векторы. Эти векторы конструируют на базе ДНК фагов с таким расчетом, чтобы в них сохранилась информация, которая обеспечивает сборку *in vivo* фаговых частиц, и чтобы имелась возможность упаковать рекДНК в фаговые головки. Фаговые векторы обладают следующими особенностями. Некоторые такие векторы и рекДНК, сконструированные на их основе, можно упаковать *in vitro* в капсиды, что значительно увеличивает эффективность их введения в реципиентные клетки. Иногда фаговые рекДНК можно селективно отбирать в составе частиц. Фаговые векторы позволяют клонировать гены, продукты которых токсичны для клетки, так как они не оказывают вредного действия на фаг. Наконец, фаговые векторы и фаговые рекДНК относительно легко выделяются из клеток без примеси бактериальной ДНК, поскольку при этом они находятся в составе фаговых частиц.

СИСТЕМЫ КЛОНИРОВАНИЯ В КЛЕТКАХ *E. coli*

Плазмидные векторы. Первые плазмидные векторы pSC101 (Cohen *et al.*, 1973) и ColE1 (Hershfield *et al.*, 1974) представляют интерес лишь с исторической точки зрения. Они оба несут по одному сайту узнавания для рестриктазы *EcoRI* и использовались для клонирования *EcoRI*-фрагментов ДНК. С этой целью кольцевые векторные молекулы сначала линейаризовали рестриктазой, в результате чего образовывались 5'-выступающие одонитевые концы 5'-ААТТ-3'. Такие же концы имелись и у фрагментов чужДНК, что позволяло объединять эти молекулы благодаря их комплементарным взаимодействиям и восстанавливать ковалентные связи с помощью ДНК-лигазы (рис. 7.1). Отметим, кстати, что одновременно было предложено синтезировать комплементарные концы у взаимодействующих молекул ферментативными методами (Lobban, Kaiser, 1973; см. гл. 8). Эти процедуры получения рекДНК стали с тех пор классическими, ознаменовав начало истории генетической инженерии.

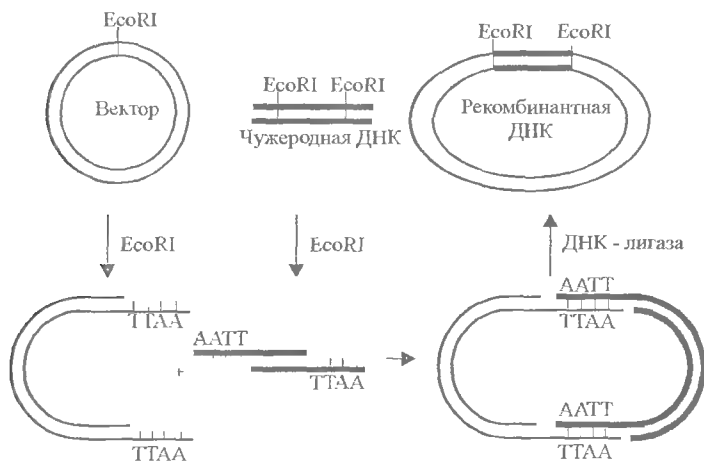


Рис. 7.1. Образование рекомбинантной молекулы ДНК с помощью рестриктазы *EcoRI* и ДНК-лигазы

Плазмида *pSCI01*. Ее размер 9,1 т.п.н. Она низкокопийна и содержит ген устойчивости к тетрациклину. При разрезании ее рестриктазой *EcoRI* репликативные гены и детерминанта устойчивости к антибиотику не затрагиваются. Поэтому трансформанты с плазмидой отыскивают по селективному маркеру. Однако найти среди них клетки с рекДНК можно только при наличии в клонируемом гене селективных свойств, что является недостатком этого вектора. С его помощью были впервые осуществлены в клетках *E. coli* экспрессия чужеродного гена (гена *Ap^R* плазмиды p1258 золотистого стафилококка; Chang, Cohen, 1974) и клонирование эукариотической ДНК (гена рибосомной РНК из ооцитов шпорцевой лягушки; Mowtow *et al.*, 1974). Во втором случае клоны с рекДНК были выявлены рестрикционным анализом плазмид, выделенных из трансформантов. Область использования вектора pSCI01 и его производных (как, собственно, и других малокопийных векторов) — это клонирование таких генов, продукты которых в большом количестве приводят к серьезным нарушениям нормального клеточного метаболизма.

Плазмида *ColEI*. Эта плазмида оказалась более удобной. Она, во-первых, мультикопийна, причем инкубация клеток в присутствии ингибиторов синтеза белка (хлорамфеникол, спектиноми-

цин и др.) доводит число ее копий на клетку до 3000 (см. гл. 3). Это позволяет выделять из 1 л культуры клеток до 1 мг плазмидной ДНК. Во-вторых, клонируемый с ее помощью фрагмент, интегрируясь в ColE1 ДНК через *EcoRI*-сайт в гене *cea*, нарушает синтез колицина (см. рис. 3.12). Бактериальные клетки, трансформированные этой плазмидой, распознают по устойчивости к колицину, обусловленной геном *imm*, а клоны с рекДНК отличают по отсутствию в них синтеза колицина.

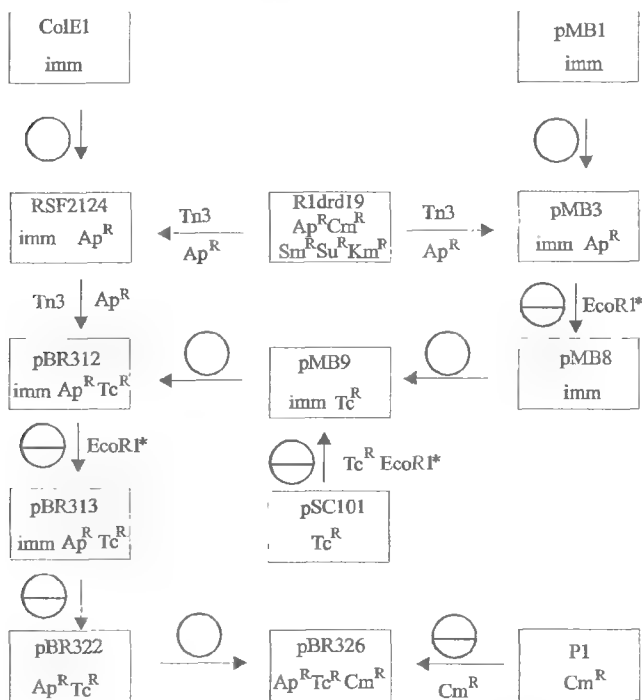


Рис. 7.2. Схема создания вектора pBR322.

О — геном использован полностью; $\ominus$ — геном использован частично; *imm* — иммунитет к колицину

Однако и плаزمида ColE1 не нашла широкого применения в качестве вектора, так как ее признак иммунитета является плохим селективным маркером. Поэтому в последующие годы на ее

основе, а также на базе репликонов мультикопийных природных плазмид — рМВ1 (родственна плазмиде ColE1 и несовместима с ней) и P15A (совместима с ColE1) были сконструированы производные векторы, содержащие высокоселективные маркеры устойчивости к антибиотикам других плазмид. Примером подобного конструирования может служить схема создания многоцелевого вектора рВR322 (рис. 7.2; Bolivar *et al.*, 1977a,b), до сих пор широко используемого в лабораторной практике.

Вектор рВR322. Этот вектор (рис. 7.3) секвенирован, в нем 4361 п.н. Он содержит репликатор плазмиды рМВ1 и сохраняет от нее свойство мультикопийности (15—20 копий на клетку) и способность к амплификации в присутствии хлорамфеникола. От плазмиды рSC101 через плазмиду рМВ9 ему передан признак устойчивости к тетрациклину, а от плазмиды Rldrd19, содержащей транспозон Tn3, через плазмиду RSF2124 — к ампициллину. Наличие в векторе двух детерминант устойчивости к антибиотикам, содержащих несколько единственных сайтов рестрикции, значительно расширяет его возможности при клонировании генов. Это позволяет вести отбор трансформантов по их устойчивости к одному антибиотику, а клоны с рекДНК выявлять после перепечатки трансформантов на соответствующие чашки по их чувствительности к другому антибиотику. Для экспериментов с внедрением чужДНК в ген Ap^R разработан метод прямой селекции Ap^S -клеток, чувствительных к ампициллину. Он основан на том, что β -лактамаза, кодируемая этим геном, превращает пенициллин в пеницилловую кислоту, которая способна связывать йод. Трансформанты отбирают на среде, содержащей тетрациклин и крахмал. Затем выросшие колонии опрыскивают раствором, содержащим пенициллин и йод, при этом Ap^R -колонии обесцвечивают индикаторный раствор, а Ap^S -колонии — не обесцвечивают.

Отметим важность наличия сайтов клонирования в промоторе гена Tc^R (рис. 7.3). Внедрение чужДНК в *Hind*III-сайт инактивирует промотор и делает трансформанты чувствительными к тетрациклину. Это обстоятельство используют для поиска фрагментов ДНК, содержащих промотор-подобные структуры. Трансформанты с такими рекДНК сохраняют устойчивость к тетрациклину.

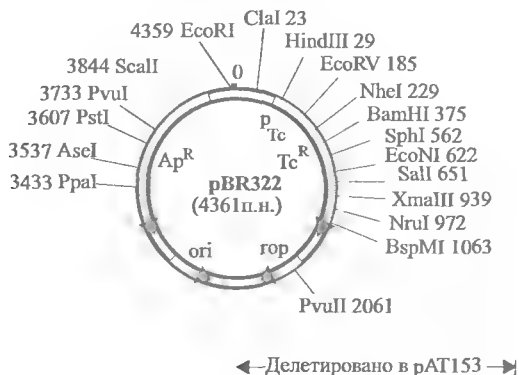


Рис. 7.3. Физическая карта вектора pBR322. Указаны единственные сайты рестрикции, находящиеся в генах Ap^R и Tc^R . Координаты отсчитываются от сайта *EcoRI*

Плазмида pBR322 достаточно стабильна: культивирование клеток *E. coli*, содержащих эту плазмиду, в отсутствие антибиотика в течение 30 генераций не приводит к ее значительной потере. Это дает возможность использовать ее в прикладных целях, поскольку масштабные ферментации обычно не превышают 30 клеточных генераций.

Имеющийся в векторе pBR322 локус *bom* (*oriT*) делает его потенциально способным к мобилизации, но локус *mob*, необходимый для этого (см. гл. 3), в нем отсутствует. Мобилизация вектора конъюгативными плазмидами возможна в присутствии совместимой плазмиды *ColK*, обладающей гомологичным локусом *mob*. Следует отметить снижение стабильности этого вектора в *recA*⁺ клетках, поскольку в нем также нет локуса *cer*.

На основе плазмиды pBR322 сконструировано много производных векторов разнообразного назначения (экспрессия генов и секреция белков, прямая селекция рекДНК, идентификация регуляторных сигналов и т. д.). При включении в плазмиду pBR322 маркера устойчивости к хлорамфениколу Cm^R , взятого из транспозона Tn9 фага P1*Cm*, образовался вектор pBR325 (см. рис. 7.2). В гене Cm^R этого вектора имеется сайт клонирования *EcoRI*, что очень удобно ввиду доступности рестриктазы *EcoRI*. Вектор pAT153 получен

делетированием участка ДНК плазмиды pBR322, в котором находятся сайт *bot* и локус с геном *rop*, контролирующим число копий плазмидных молекул (см. рис. 7.3). Поэтому плазида pAT153 не мобилизуется, а число ее копий в клетке значительно больше, чем у pBR322 (Twigg, Sherratt, 1980). Длина генома pAT153 составляет около 80 % длины pBR322.

Векторы pUC. Широкое распространение получили векторы серии pUC (рис. 7.4,а). Они были сконструированы в лаборатории Мессинга (Yanish-Perron *et al.*, 1985) и предназначены для клонирования и экспрессии генов. Копийность этих векторов достигает 500 на клетку. Их удобство заключается в том, что селективным признаком для отличия вектора от рекДНК служит Lac-фенотип реципиентных клеток. Основа векторов pUC — часть плазмиды pBR322, содержащая *ori*-сайт и ген *Ap^R*, а их “изюмина” — экспрессионные кассеты, взятые из одонитевых векторов M13mp (см. с. 214). Номера pUC- и M13mp-векторов совпадают, если кассеты одинаковы (см. рис. 7.4). Экспрессионной кассетой называют блок регуляторных последовательностей, обеспечивающих транскрипцию клонируемых генов. В векторах M13mp и pUC в эту кассету входят регуляторная часть *lac*-оперона (в том числе и ген-репрессор *lacI*) и начальная часть гена *lacZ* (локус *lacZ'*), кодирующая так называемый α -пептид β -галактозидазы, состоящий из 145 аминокислот. Этот пептид способен комплементировать *in vivo* дефектный бактериальный белок β -галактозидазу, у которой отсутствуют аминокислоты с одиннадцатой по сорок первую в N-концевой части (делеция *lacZ*ΔM15; Ullmann, Perrin, 1970). В результате трансформация плазмидой pUC клеток, имеющих частичную делецию начальной части гена *lacZ*, приводит к изменению их фенотипа от Lac⁻ к Lac⁺ (эффект α -комплементации).

Для создания в локусе *lacZ'* сайта клонирования в нем был сначала образован *EcoRI*-сайт. С этой целью методом локализованного мутагенеза (см. гл. 8) в 5-м кодоне гуанин был заменен аденином:



что привело к смене аспартата на аспарагин в α -пептиде, но не нарушило его комплементационную активность. В образовавшийся-

ся сайт можно вводить полилинкеры с числом нуклеотидных пар, кратным трем. При этом комплементационная активность α -пептидов сохраняется на прежнем уровне, так как сдвига рамки считывания при трансляции не происходит. Интеграция чужДНК в вектор через полилинкер вызывает инактивацию α -пептида, что позволяет отбирать среди ампициллин-устойчивых трансформантов клоны с рекДНК по Lac⁻ фенотипу реципиентных клеток. Колонии таких клеток на плотных средах с хромогенным субстратом X-gal (5-бром-4-хлор-3-индол- β -D-галактозид) и индуктором *lac*-оперона IPTG (изопропил- β -D-тиогалактозид) бесцветны, в то время как Lac⁺ колонии окрашены в голубой цвет. Близость лактозного промотора к полилинкерам обеспечивает возможность экспрессии в векторах рUC генов, клонированных с помощью различных рестриктаз.

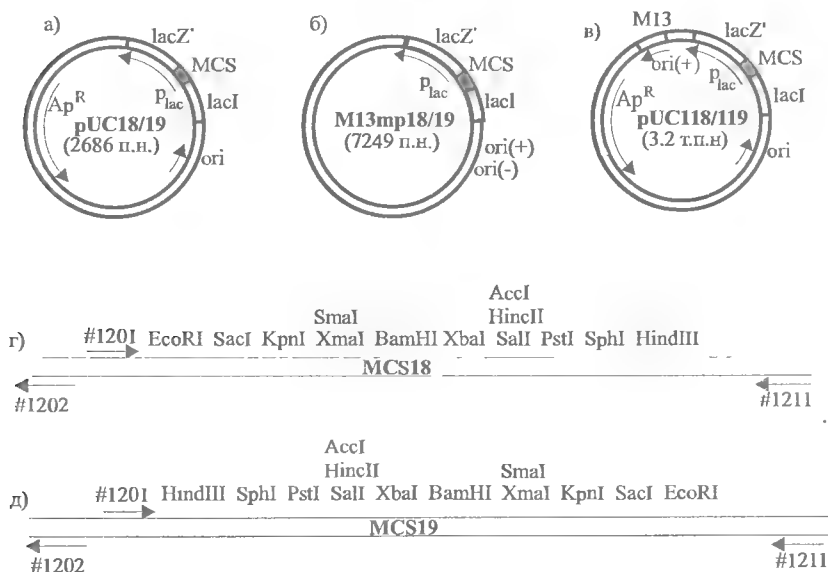


Рис. 7.4. Строение векторов pUC18/19 (а), M13mp18/19 (б), pUC118/119 (в) и их сайтов поликлонирования MCS18 (г) и MCS19 (д).

Праймеры (указаны по каталогу фирмы "New England Biolab") #1201 и #1211 предназначены для секвенирования, праймер #1202 — для синтеза гибридизационных зондов

Система с α -комплементацией оказалась настолько удобной и эффективной, что стала применяться во многих других векторах — плазмидных и фаговых. Была предложена и альтернативная система, основанная на использовании генов *luxAB*, кодирующих люциферазу. Люцифераза катализирует окисление восстановленной формы флавиномононуклеотида (FMNH_2) и алифатических альдегидов, имеющих длинную цепочку: $\text{FMNH}_2 + \text{RCHO} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{FMN} + \text{RCOOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{свет}$. Клетки *E. coli* способны вести эту реакцию, если снабдить их люциферазой и добавить в среду соответствующий альдегид (например, додеканаль). Гены *luxAB* из *Vibrio harveyi* были клонированы и экспрессированы в *E. coli* с помощью плазмидного вектора. В ген *luxB* был вставлен полилинкер, не нарушающий синтез люциферазы (Sevigny, Gossard, 1990). Интеграция чужДНК в полилинкер приводила к гашению биолюминесценции, позволяя отбирать необходимые трансформанты. Преимущество этой системы — возможность использовать любые клетки *E. coli* и даже энтеробактерии.

Плазмида P15A. Эта плазмида, выделенная из штамма *E. coli* 15, относится к ColE1 — типу репликонов, но совместима с другими плазмидами этого типа. Это позволяет использовать ее для совместной трансформации с другими плазмидами, например, с плазмидой pBR322. Системы из двух векторов удобны для регуляции экспрессии клонируемого гена, поскольку позволяют расположить структурный и регулирующий гены на разных плазмидах (см. гл. 10). Сама плазмида P15A криггическая, т. е. не придает клеткам какой-либо определяемый фенотип. Поэтому при конструировании векторов к ее репликатору присоединяют фрагменты ДНК, содержащие селективные маркеры. Так, вектор pACYC177 состоит из репликатора P15A, гена Km^R из транспозона Tn903 и гена Ap^R из транспозона Tn3 (рис. 7.5,а). Этот репликатор имеется и в векторе pOK12, который по структуре сходен с векторами типа pUC, но содержит маркер Km^R (Vieira, Messing, 1991).

Векторы прямой селекции. Такие векторы содержат ген (или сайт), продукт которого (или сама последовательность) в определенных условиях является “ядом” для клеток. Мишенью может быть ген-репрессор, контролирующий ген антибиотикоустойчивости или цитотоксические гены (например, *kil*, *ccd*), находящиеся под строгим контролем. Инактивация подобных генов внедрением в

них чужДНК позволяет трансформантам выжить в этих условиях. Основное затруднение при работе с такими векторами связано с необходимостью использовать специальные штаммы бактерий или среды. Другой недостаток этих векторов — невозможность во многих случаях использования полилинкеров, так как их введение обычно инактивирует ген. Наиболее практичен вектор pLX100, содержащий ген ксилозизомеразы *xylA* под контролем лактозного промотора. Высокий уровень концентрации этого фермента не позволяет клеткам *E. coli* расти на минимальных средах с ксилозой. Внедрение чужДНК в ген *xylA* через единичные сайты *Bam*HI, *Hind*III, *Pst*I или *Xho*I инактивирует этот ген и способствует выживанию только трансформантов, имеющих рекомбинантную плазмиду (Stavis, Ho, 1987).

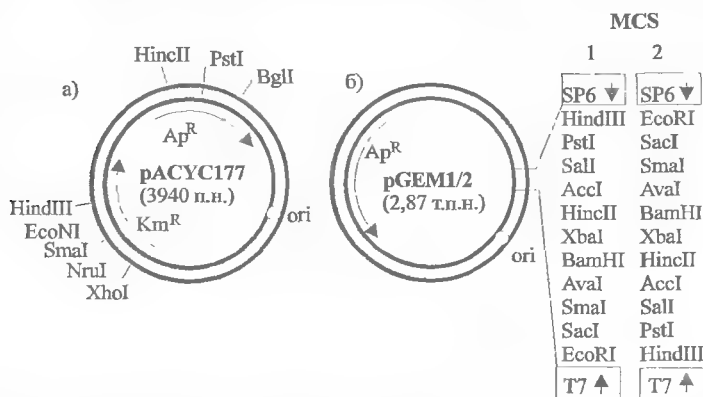


Рис. 7.5. Строение векторов pACYC177 (а) и pGEM1 и pGEM2 (б). Стрелки в MCS указывают на направление транскрипции с фазовых промоторов SP6 и T7. Указаны только единственные сайты рестрикции

Векторы pGEM. Описанные плазмидные векторы пригодны лишь для клонирования генов в клетках *E. coli* и родственных им грамотрицательных бактерий, например, *Salmonella* и *Serratia*. Они универсальны — их используют для самых разнообразных целей. В то же время сконструировано много специальных векторов, приспособленных, например, только для идентификации регуляторных сигналов, для суперпродукции чужеродных белков и их секреции, для секвенирования ДНК, экспрессии генов животных в

бактериях и т. д. Некоторые из них описаны в последующих главах. Здесь же еще раз отметим особенность современных векторов, предлагаемых фирмами. Они, во-первых, содержат полилинкеры, причем для удобства пользования их внедряют в противоположных направлениях. Таким образом, векторы выпускаются парными, что отражается в порядковом номере при их названии. Во-вторых, у векторов на концах полилинкеров находятся промоторы фагов SP6, T3 и/или T7. Это позволяет осуществлять транскрипцию клонированного гена *in vitro* в обоих направлениях с целью использования транскриптов в качестве гибридизационных зондов или для транслирования в белок-синтезирующей системе. Примером могут служить векторы pGEM1 и pGEM2 (фирма “Промега”, рис. 7.5,б).

Трансформация клеток *E. coli*. Плазмидные векторы и рекДНК, сконструированные на их основе, вводят в реципиентные клетки методом генетической трансформации, т. е. путем обработки клеток изолированной ДНК. Возможность трансформации бактерий зависит от их компетентности, т. е. от способности пропускать ДНК через клеточную стенку. Для некоторых родов бактерий (*Bacillus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Streptomyces* и др.) состояние компетентности естественно. В большинстве же случаев его приходится вызывать искусственно. Наиболее распространены обработка клеток двухвалентными катионами “на холоду” и электропорация (пробой клеточной стенки электрическим током). Известно также, что последовательные циклы замораживания и оттаивания ослабляют клеточную стенку и делают ее проницаемой для вхождения ДНК в клетку. Отметим для полноты картины, что трансформировать можно и бактериальные протопласты или сферопласты, добавляя к ним в присутствии полиэтиленгликоля изолированную ДНК или ДНК, включенную в искусственные мембраны — липосомы.

Трансформацию клеток *E. coli* плазидами можно вести любым из вышеперечисленных методов, но наиболее распространен благодаря своей простоте так называемый кальциевый метод. Он основан на обнаруженном Манделем и Хига (Mandel, Higa, 1970) факте, что клетки, выдержанные на холоду, в присутствии хлористого кальция становятся компетентными для их трансформации

(трансфекции) изолированной ДНК фага λ . Это наблюдение оказалось справедливым и для плазмид (Cohen *et al.*, 1972), причем эффективность трансформации достигает 10^7 трансформантов на 1 мкг ДНК pBR322. В типичных экспериментах клетки, выращенные до логарифмической фазы роста, концентрируют до плотности 10^{10} клеток в мл в холодном 50 мМ растворе CaCl_2 и помещают на лед на 30 минут. К клеткам, которые становятся компетентными в результате этих процедур, добавляют плазмидную ДНК, выдерживают их на льду еще 30 минут, подвергают тепловому шоку при 42°C в течение двух минут и затем высевают на чашки с селективной средой. Перед последним этапом клетки обычно инкубируют 30—60 минут в питательной неселективной среде, чтобы позволить селективному маркеру проявиться фенотипически.

Эффективность трансформации зависит и от бактериального штамма, и от структуры трансформирующей ДНК. Двунитевые и однострунчатые кольцевые молекулы, а также линейные молекулы с концевыми шпильками, замыкающими ковалентно обе нити ДНК, хорошо трансформируют клетки, в то время как линейные молекулы ДНК с открытыми концами ведут трансформацию на два-три порядка хуже. Это вызвано тем, что такие молекулы гидролизуются в клетках *E. coli* экзонуклеазой V, кодируемой генами *recBCD*. Поэтому в подобных случаях реципиентные клетки должны быть мутантными по этим генам. При этом, конечно, они теряют способность к гомологической рекомбинации. Для ее восстановления, когда это необходимо (например, если трансформация ведется бактериальной ДНК), в клетки дополнительно вводят мутации *shcA* или *shcB*.

Компетентность клеток можно вызвать, подвергнув их действию кратковременного электрического импульса, что приводит к появлению пор в клеточных стенках, пропускающих ДНК внутрь клетки. Отсюда и название этого метода — электропорация или электротрансформация. Первоначально он был предложен для эукариотических клеток (Neumann *et al.*, 1982), а затем исследован и применительно к клеткам *E. coli* (Dower *et al.*, 1988). В последнем случае было найдено, что максимальная эффективность трансформации (3×10^9 трансформантов на 1 мкг ДНК pBR322) достигается,

когда после импульса выживает 30—40% клеток. При этом существует обратная зависимость между величиной напряженности электрического поля и продолжительностью импульса, которым подвергают клетки. Доля трансформированных клеток линейно возрастает с увеличением концентрации добавляемой ДНК. В оптимальных условиях до 80 % клеток становятся “компетентными” для электротрансформации. Процедура трансформации заключается в следующем. Клетки в логарифмической фазе роста концентрируют до 4×10^{10} клеток в мл в охлажденном 10 %-ном растворе глицерина, добавляют к ним ДНК, после чего смесь, находящуюся в кювете шириной 0,2 см, подвергают электрическому импульсу напряженностью 12,5 кВ/см и продолжительностью 5 мс. Далее клетки немедленно переводят в питательную среду и после аэрации в течение одного часа при 37 °С высевают на чашки с селективной средой.

Недостаток метода электропорации — существенная зависимость эффективности трансформации от размера трансформирующей ДНК, а для больших молекул ДНК появляется также зависимость от используемого штамма. Для лучшего из штаммов *E. coli* (DH10B) эта величина снижается от $2,3 \times 10^9$ колоний на 1 мкг ДНК для плазмид размером 7,3 т.п.н. до $1,2 \times 10^6$ для плазмид размером 240 т.п.н. (Sheng *et al.*, 1995). В пересчете на эквимольные соотношения эффективность уменьшилась в 50 раз. Таким образом, при электротрансформации клеток смесью плазмид, например, при получении банка генов (см. гл. 9), большие плазмиды будут недопредставлены.

Бактериальные клетки, утратившие свою стенку частично (сферопласты) или полностью (протопласты), но сохранившие цитоплазматическую мембрану, также можно использовать для трансформации. Однако у грамотрицательных бактерий этот метод не получил распространения из-за сложности строения клеточной стенки (см. рис. 10.2).

Штаммы *E. coli* K-12, наиболее часто используемые в качестве реципиентных клеток, перечислены в табл. 7.1. Характерная особенность их — наличие мутаций *hsdR* или *hsdS* в клетках, которые предназначены для введения в них чужДНК. Эти мутации блокируют клеточную систему рестрикции и предохраняют тем самым клонируемые фрагменты от действия рестриктазы *EcoK*.

Фаговые векторы

Напомним, что фаговые векторы конструируют на базе ДНК фагов с таким расчетом, чтобы в них сохранилась информация, которая обеспечивает сборку *in vivo* фаговых частиц. Для клонирования в клетках *E. coli* такие векторы разработаны на базе ДНК фагов λ и M13. В первом случае фаговые головки имеют строго определенную геометрию, так что векторы способны включать такое количество чужДНК, чтобы образовавшиеся рекДНК могли упаковаться в головки фага. По этой причине векторы характеризуются своей емкостью. Для нитевидных фагов, к которым относится M13, понятие емкости не применимо, величина клонируемой в них ДНК определяется требованиями эксперимента к стабильности фаговых частиц.

Векторы, сконструированные на основе ДНК фага λ . Фагу λ самой природой была уготована роль переносчика чужих генов *in vivo* (см. гл. 4) и *in vitro*. Действительно, в середине его генома имеется область, несущественная для развития фага (см. рис. 4.1). Она замещается на бактериальные гены при образовании трансдуцирующих фагов (см. рис. 4.3) и она же используется для внедрения чужДНК в вектор методами *in vitro*.

Фаговые векторы подразделяются на векторы внедрения и векторы замещения (рис. 7.6). Первые несут один сайт узнавания для избранной рестриктазы, поэтому у них, как и у плазмидных векторов, длина рекДНК равна сумме длин вектора и клонируемого фрагмента. Векторы замещения имеют два сайта узнавания для используемой рестриктазы, поэтому в такие векторы клонируемые фрагменты ДНК вставляют вместо участков, ограниченных данными сайтами. В обоих случаях в реакциях образования рекДНК участвуют два фрагмента λ ДНК (левое и правое плечи векторного генома, имеющие на одном из своих концов *cos*-сайт) и фрагмент чужДНК. Под действием лигазы благодаря *cos*-сайтам прежде всего объединяются разные плечи λ ДНК. Затем образовавшиеся векторные молекулы реагируют с чужДНК и друг с другом, формируя конкатемеры. Они являются субстратом при сборке фаговых частиц *in vitro* (см. с. 212).

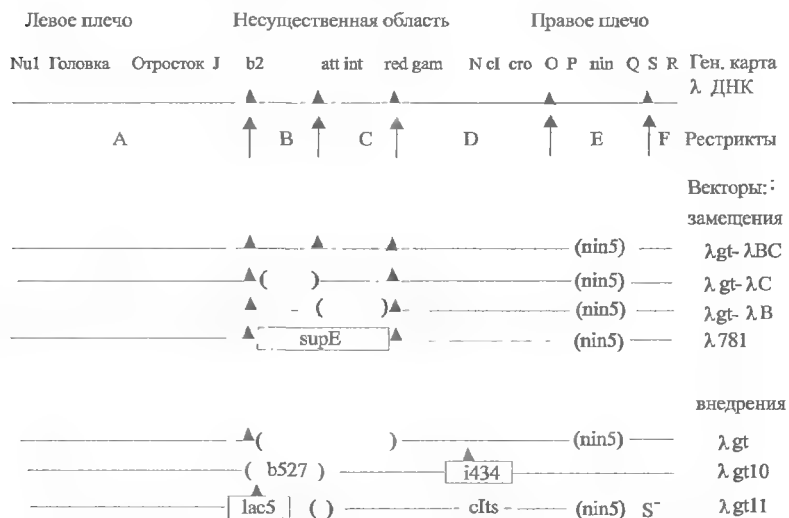


Рис. 7.6. Фаговые векторы замещения и внедрения, сконструированные на основе λ ДНК для клонирования *EcoRI*-фрагментов.

□ — вставки; i434 — вставка локуса иммунитета фага 434

При работе с векторами замещения после их расщепления рестриктазами возникает проблема с буферными фрагментами, которые в процессе клонирования могут снова вставляться в вектор вместо чужДНК, уменьшая тем самым выход рекДНК. Проблему решают очисткой векторных плеч: 1) используя препаративный электрофорез в 0,5%-ном агарозном геле или 2) центрифугируя в градиенте плотности сахарозы или NaCl. Эффективность очистки повышается, если предусмотрена возможность расщепления буферных фрагментов действием какой-либо иной рестриктазы. Другая возможность — дефосфорилирование 5'-концов плеч вектора в местах “разреза” и буферных фрагментов, что предотвращает их лигирование (метод описан в гл. 8). В этом случае ДНК предварительно выдерживают один час при 42 °С, позволяя плечам объединиться через *cot*-сайты и предохраняя их тем самым от действия щелочной фосфатазы. Дефосфорилирование 5'-концов ДНК в местах “разреза” применяют и при использовании векторов внедрения с целью предотвращения самолигирования плеч вектора.

Емкость фагового вектора, т. е. теоретически наибольший размер чужДНК, вставляемой в него, вычисляется как разность между максимальной величиной молекулы ДНК, упаковываемой в головку фага λ (она равняется 52 т.п.н.), и минимальной величиной генома фага, необходимой для его развития. Последняя, в свою очередь, подсчитывается как разность между длиной ДНК (48,5 т.п.н.) и суммарной длиной областей, несущественных для развития фага. К ним относится область в центре генома между генами *J* и *N* размером 16 т.п.н. и область *nin* между генами *P* и *Q* размером 3,5 т.п.н. Таким образом, минимально возможный размер векторов, сконструированных на основе λ ДНК, 29 т.п.н. ($48,5 - 16 - 3,5$), а максимальная величина вставки (теоретическая емкость) 23 т.п.н. ($52 - 29$).

Реальная емкость вектора определяется не только его размером, но и минимальной величиной ДНК, которая может упаковаться в фаговую головку (36 т.п.н.). Поэтому вводятся понятия максимальной и минимальной емкости фаговых векторов. Под этими понятиями подразумевается максимальное и минимальное количество ДНК, которое можно клонировать в векторе. Эти величины определяются как разность, соответственно, между максимальным или минимальным размером упаковываемой ДНК и суммарным размером плеч вектора. Например, если у вектора сумма плеч равна 34 т.п.н., то в нем можно клонировать фрагменты ДНК размером от 2 (минимальная емкость) до 18 т.п.н. (максимальная емкость). Отметим, что если в последнем примере вектор является вектором внедрения, то он не образует жизнеспособных фагов, а рекДНК, сделанная на его основе, образует. Это обстоятельство можно использовать как фактор прямой селекции рекомбинантных фагов, несущих вставки чужДНК.

Отбор фагов, содержащих только рекДНК, ведут методом прямой или непрямой селекции. Для прямой селекции удобно использовать фаговые гены *exo*, *bet* (совместно их обозначают через *red*) и *gam* (см. табл. 4.1), присутствующие в буферном фрагменте. Метод основан на неспособности фага λ дикого типа развиваться в клетках с профагом P2 (Spi^+ фенотип). Те фаги, у которых произошла инактивация этих генов или их замена на чужДНК, развиваются в таких клетках. Напомним, что фаги $\lambda red^+ gam^+$ не развиваются в *recA* клетках и формируют лишь маленькие негативные колонии на

газоне *recA*⁺ клеток (см. гл. 4). Поэтому для повышения жизнеспособности рекомбинантных фагов в векторы подобного типа вводят сайт *chi*, который служит “горячей точкой” *recA* — зависимой рекомбинации. В векторах внедрения для генетической метки рекомбинантных фагов применяют гены *exo* и *cI*, вводя в них сайты клонирования. Фаги, имеющие вставку в ген *exo*, перестают развиваться в клетках с мутациями в генах *polA* или *lig*, что и позволяет отличать их от самого вектора. Внедрение чужДНК в ген *cI* вызывает инактивацию фагового репрессора, в результате чего рекомбинантные фаги образуют прозрачные негативные колонии, так как они теряют способность лизогенизовать клетки. Для таких фагов возможна прямая селекция с помощью бактериального мутанта *hft* (high frequency of lysogenization), в котором фаги с геном *cI*⁺ не развиваются из-за 100%-ной лизогенизации ими клеток.

Стратегию конструирования фаговых векторов можно рассмотреть на примере создания первых векторов (Tomas *et al.*, 1974), предназначенных для работы с рестриктазой *EcoRI*. В ДНК фага λ дикого типа имеется 5 *EcoRI*-сайтов, причем три из них располагаются в центральной области, где локализованы существенные гены, а два сайта затрагивают важные гены (см. рис. 7.6). Конечно, сайты рестрикции, используемые для клонирования, не должны затрагивать существенные гены. Поэтому авторы отобрали жизнеспособные варианты фагов, у которых два последних сайта были изменены. На их основе были созданы векторы серии λ gt (general transduction), причем для увеличения их емкости в них была внесена делеция *nin5* размером 2,8 т.п.н.

В базовой конструкции λ gt отсутствуют центральные фрагменты В (4,8 т.п.н.) и С (5,5 т.п.н.), поэтому ее, казалось бы, можно было использовать как вектор внедрения. Размер такого вектора (48,5 – 2,8 – 4,8 – 5,5 = 35,4 т.п.н.) был бы недостаточен для упаковки в фаговую головку, что давало бы возможность прямого отбора рекДНК в виде фаговых частиц. Однако на практике подобные векторы можно использовать, если только предлагаются способы наработки их ДНК. Известны два таких способа — внедрение в вектор плазмидного репликатора (см. “фазмиды” в данной главе) или буферных фрагментов, увеличивающих его до размеров, которые обеспечивают упаковку вектора в головку фага. Вторым способом реализован в векторах замещения λ gt- λ BC, λ gt- λ B и λ gt- λ C, в которых сохранены *EcoRI*-

рестрикты В и/или С (см. рис. 7.6). У вектора λ gtWES- λ В в гены *W*, *E* и *S* введены супрессорчувствительные мутации, в результате чего его выживаемость в клетках *E. coli* дикого типа (имитация природных условий) была снижена до величины менее 10^{-8} . Этот вектор используют при необходимости обеспечить нужный уровень биологической защиты (см. раздел “Меры безопасности” в приложении). В векторе λ 781 в качестве буферного фрагмента использован *EcoRI*-рестрикт с бактериальным геном *supE*. Этот ген супрессирует амбер-мутацию в гене *lac*, находящемся в хромосоме реципиентных клеток. Поэтому клоны, в которых произошла замена гена на чужДНК, отбирают по отсутствию у них фенотипа Lac^+ , что отражается на окраске негативных колоний, выросших на специальных средах.

Кроме векторов, приспособленных для работы с рестриктазой *EcoRI*, во второй половине семидесятых годов были созданы векторы и для многих других рестриктаз. Принципы их конструирования сходны с вышеописанными. Например, широкое распространение получили векторы-хароны (Blattner *et al.*, 1977), названные так по имени мифического перевозчика через реку Стикс. Для удаления из правого плеча харонов нежелательных сайтов рестрикции были использованы аналогичные по функциям участки ДНК других лямбдоидных фагов, а также различные делеции. В центральной части замещения, делеции, дупликации и вставки подбирались так, чтобы ввести в векторы нужные сайты рестрикции. В результате с помощью полученных векторов можно клонировать фрагменты ДНК разной длины, используя при этом различные рестриктазы. Всего было сконструировано несколько десятков харонов.

На рис. 7.7 представлена схема вектора λ Ch4A. Сайты *EcoRI* были внесены в него с помощью генов *lac* и *bio*. С этой рестриктазой его используют как вектор замещения (максимальная емкость 20,1 т.п.н., минимальная — 7,1 т.п.н.) для конструирования геномных библиотек эукариотической ДНК (см. гл. 9). Рекомбинантные фаги приобретают фенотип Lac^-Bio^- , что можно использовать для их отбора. С рестриктазой *XbaI* харон λ Ch4A используется как вектор внедрения (емкость 6 т.п.н.). Вектор содержит амбер-мутации в генах *A* и *B*, поэтому реципиентные клетки должны обладать генами-супрессорами (рекомендуются клетки LE392, см. табл. 7.1). Эти мутации введены с целью поиска рекомбинантных клонов методом рекомбинации *in vivo* (Seed, 1983; см. гл. 9).

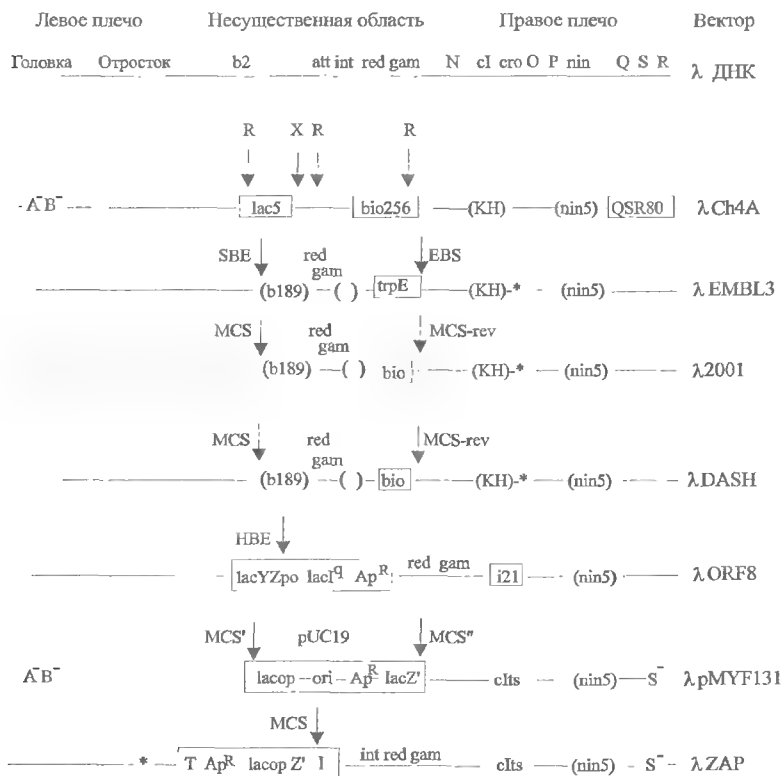


Рис. 7.7. Современные фаговые векторы, сконструированные на основе λ ДНК: MCS — сайт поликлонирования. Сайты рестрикции: B — *Bam*HI, E — *Eco*RI, H — *Hind*III, S — *Sal*I, X — *Xho*I. MCS вектора λ2001: *Xba*I — *Sac*I — *Xho*I — *Bam*HI — *Hind*III — *Eco*RI — *Xba*I; MCS-rev — порядок сайтов обратный. MCS вектора λDASH: *Xba*I — *Sal*I — pT3 — *Eco*RI — *Bam*HI — *Hind*III — *Sac*I — *Xho*I — *Xba*I; MCS-rev — порядок сайтов обратный. Но вместо промотора фага T3 (pT3) стоит промотор фага T7 (pT7). MCS' вектора λpMYF131: *Bam*HI# — *Xba*I — *Sal*I — *Pst*I — *Sph*I — *Hind*III. MCS'' вектора λpMYF131: *Bam*HI# — *Sma*I — *Kpn*I — *Sac*I — *Eco*RI. MCS вектора λZAP: pT3 — *Sac*I — *Not*I — *Xba*I — *Spe*I — *Bam*HI# — *Sma*I# — *Eco*RI — *Hind*III# — *Sal*I# — *Xho*I — *Kpn*I — pT7. Значок # указывает, что сайт не единственный. Стрелка указывает на положение сайта рестрикции или полилинкера. () — делеции; — вставки; * — *chi*-сайт инициации *recA*-зависимой рекомбинации; KH — делеция KH54 генов *rex* и *cI*; QSR80 — вставка из ДНК фага φ80; i21 — вставка локуса иммунитета фага 21; I и T — сайты инициации и терминации репликации фага f1 в векторе λZAP

Емкость вектора замещения λ EMBL3 (Frischauf *et al.*, 1983) 7–20 т.п.н., что позволяет использовать его для конструирования геномных библиотек (см. гл. 9, рис. 9.1). Его буферный фрагмент содержит гены *red* и *gam*, а сам фрагмент ограничен с обеих сторон полилинкером, в который входят сайты клонирования *SalI*, *BamHI* и *EcoRI* (см. рис. 7.7). В рекомбинантных фагах гены *red* и *gam* отсутствуют, что делает возможным их отбор по Sp^i фенотипу.

Более универсальны благодаря сайтам поликлонирования векторы λ 2001 (Karn *et al.*, 1984) и λ DASH (Sorge, 1988), которые также предназначены для конструирования геномных библиотек. Их емкость 10–22 т.п.н. Промоторы фагов T3 и T7, имеющиеся на концах полилинкеров у вектора λ DASH (см. рис. 7.7), позволяют транскрибировать любую из нитей встроенного фрагмента ДНК. Полученные транскрипты можно использовать для “прогулок по хромосоме” (см. гл. 9) с целью генетического картирования. Отбор рекомбинантных фагов ведут по Sp^i фенотипу, используя рекомендуемый штамм NM539 (см. табл. 7.1).

Векторы внедрения имеют меньшую емкость, и поэтому используются главным образом для создания банков кДНК. В векторе λ gt10 (емкость 0–6 т.п.н.) единственный *EcoRI*-сайт находится в гене репрессора *cI*, который взят от фага 434 (см. рис. 7.6.). Вставка кДНК в этот сайт инактивирует ген, поэтому рекомбинантные фаги легко выявляются с помощью бактериальных штаммов, содержащих мутацию *hfr*⁻. Вектор λ gt11 (емкость 0–7 т.п.н.), у которого единственный *EcoRI*-сайт находится в концевой части гена *lacZ*, предназначен для экспрессии клонированных кДНК, если они оказываются в одной рамке с начальной частью этого гена (Huyh *et al.*, 1985). Образующийся рекомбинантный белок может быть выявлен иммунологическим скринингом (см. гл. 9). Мутация *Sam100* в непермиссивных клетках обеспечивает наработку белка в больших количествах, а термочувствительная мутация *cIts* позволяет управлять процессом лизиса клеток. Сходная идея осуществлена и в векторе λ ORF8 (Meissner *et al.*, 1987), имеющем полилинкер в 5' кодирующей области гена *lacZ* (см. рис. 7.7). Клонирование кДНК в рамке с геном *lacZ* позволяет осуществлять его экспрессию и иммунологический скрининг рекомбинантных клонов. Максимальная емкость этого вектора 9 т.п.н.

Некоторые фаговые векторы в зависимости от состояния их *att*-сайта и гена *int* могут лизогенизировать реципиентные клетки. Такими векторами удобно пользоваться, если необходимо длительно поддерживать в клетке клонируемые гены. В этом случае амплификация генов и их продуктов достигается индукцией лизогенных или инфицированием реципиентных клеток рекомбинантным фагом.

Сборка фагов λ *in vitro*. Фаговые векторы и созданные на их основе рекДНК можно вводить в клетки *E. coli* методом трансформации, называемой в таком частном случае трансфекцией. Однако эффективность этого метода невелика. В норме λ ДНК трансфицирует клетки с выходом около 10^5 негативных колоний на 1 мкг ДНК, но после операций *in vitro* эта величина падает на один-два порядка. Поэтому обычно применяют метод инфицирования реципиентных клеток реконструированными *in vitro* фагами, позволяющий повысить эффективность ввода в клетки рекомбинантных фагов на два-три порядка и получать до 10^7 – 10^8 негативных колоний на 1 мкг векторной ДНК, подвергнутой реакциям рестрикции и лигирования.

Предложены два варианта сборки — с использованием одного или двух бактериальных штаммов. Они отличаются подходами к решению главной проблемы — к предотвращению упаковки *in vivo* эндогенной фаговой ДНК в фаговые головки при подготовке упаковочных препаратов. В первом варианте (Hohn, Murray, 1977) в пробирку с λ ДНК добавляют определенные количества двух лизатов, один из которых содержит дефектные фаговые головки (структура II, см. рис. 4.2), а другой — все белки головки, кроме основного (gpE). Эти лизаты получают индукцией теплом лизогенов, содержащих, соответственно, профаги λ clts Dam Sam7 b2red и λ clts Eam Sam7 b2red. Мутации профагов создают оптимальные условия для сборки фагов *in vitro*. В частности, делеция b2 препятствует исключению ДНК профагов из бактериальных хромосом и тем самым устраняет возможность ее упаковки в головку фага в самой клетке. Мутация am7 в гене S на порядок увеличивает выход фаговых продуктов из клетки. Мутации red в профаге и recA в лизогенных бактериях предотвращают появление в лизатах рекомбинационных ферментов и

возможную рекомбинацию *in vitro* между добавляемой ДНК и следами фаговой ДНК, находящейся в лизатах.

Второй вариант разработан в лаборатории Сталя (Rosenberg *et al.*, 1985). Препарат для упаковки — лизат, полученный индукцией теплом лизогена с профагом λ clts cos2 red xis1 Sam7. Упаковке *in vivo* эндогенной фаговой ДНК в головку препятствуют делеция cos-сайта (cos2), а также мутация xis1, блокирующая исключение профага из бактериальной хромосомы. Остальные мутации играют ту же роль, что и в первом варианте.

Упаковку λ ДНК осуществляют в присутствии АТФ. Как было выяснено, необходимое и достаточное условие для упаковки — наличие в молекуле ДНК двух cos-сайтов, ориентированных в одном направлении и разделенных 36—52 т.п.н. Поэтому субстратами для упаковки являются кольцевые или линейные димеры и более высокие олигомеры λ ДНК; мономерные молекулы не упаковываются ни *in vivo*, ни *in vitro*. Эффективность упаковки молекул ДНК с минимально возможной длиной (около 36 т.п.н.) на два порядка ниже, чем у ДНК фага дикого типа. Чтобы избежать этого осложнения в буфер добавляют поликатионные амины — спермидин и путресцин, повышающие гибкость молекул ДНК. Вслед за процессом упаковки происходит сборка целого фага: к зрелым головкам (структура IV) присоединяются готовые хвостовые отростки, присутствующие в лизатах.

Векторы, созданные на базе ДНК нитевидных фагов. Близкородственные нитевидные колифаги M13, f1 и fd обладают однонитевой кольцевой ДНК, состоящей из 6,4 тыс. нуклеотидов, и имеют ряд свойств, позволяющих использовать их в качестве векторов. Во-первых, в их ДНК между генами II и IV (см. рис. 4.12) есть межгенный участок (спейсер), в который можно вставлять чужеродные гены. Во-вторых, размер капсиды зависит от длины упаковываемой молекулы ДНК, что позволяет клонировать фрагменты ДНК размером до 15 тыс. нуклеотидов. В-третьих, они образуют фаголизаты с высокой концентрацией (до 10^{12} частиц в 1 мл) и, таким образом, позволяют получать большие количества векторной и клонируемой ДНК. Преимущества однонитевых векторов являются следствием особенностей развития нитевидных фагов, описанных в гл. 4.

Генно-инженерные операции с однокитевыми векторами и процедуры по их конструированию ведутся, конечно, с использованием двукитевых репликативных форм (РФ) ДНК. Создание подобных векторов сводится к введению в спейсеры единичных сайтов рестрикции, а также селективных маркеров. Основная особенность этих векторов — возможность работать с ними и как с плазмидами, используя РФ ДНК, и как с фагами. Доступность клонируемых генов сразу в одно- и двукитевой формах значительно облегчает их структурный и функциональный анализ. Получение клонированных генов в однокитевой форме необходимо для секвенирования генов по Сэнгеру, для сайт-специфического мутагенеза (см. гл. 8) и для приготовления гибридизационных зондов. Главный недостаток однокитевых векторов — нестабильность клонируемых в них чужДНК, обусловленная тем, что фаги с большими вставками развиваются медленнее. Поэтому уменьшение их длины является фактором селекции.

Широкое распространение получили векторы серии M13mp, созданные в 1977–1983 годах в лаборатории Мессинга (см. обзор Messing, 1983), в которых селективным признаком для отличия вектора от рекДНК служит фенотип Lac⁺ или Lac⁻ трансфицированных клеток. Эти векторы содержат *Hind*III-фрагмент *lac*-оперона, ввденный в спейсер между II и IV генами фага M13 через *Bsu*I-сайт и модифицированный так, как это описано ранее в данной главе. Для проведения селекции по эффекту α-комплементации реципиентный штамм должен содержать делеционный вариант *lacZ*ΔM15 гена β-галактозидазы и F-плазмиду для обеспечения адсорбции фагов на клетки (например, штаммы JM103 и XS127, см. табл. 7.1). Мутация *lacI*^q приводит к 10-кратному повышению синтеза Lac-репрессора, полностью предотвращая экспрессию клонируемого гена, когда она нежелательна.

Введение в бактерии векторов типа M13mp осуществляют трансфекцией клеток *E. coli* кальциевым методом, причем двукитевая ДНК трансфицирует более эффективно, чем однокитевая. В зависимости от условий трансфицированные клетки выявляют как инфекционные центры, образующиеся на газонах чувствительных бактерий, или как бактериальные колонии. Поиск рекДНК предпочтительнее вести среди инфекционных центров, так как их выход на порядок выше выхода бактериальных клонов, что объясня-

ется пониженной жизнеспособностью кальцинированных клеток. Клетки, инфицированные нитевидными фагами, продолжают делиться, поэтому из негативных колоний можно выделять жизнеспособные клетки, содержащие фаги.

Векторы серии M13mp отличаются только полилинкерами, что дает возможность использовать при работе с ними универсальные праймеры, в которых последовательность нуклеотидов комплементарна участкам локуса *lacZ'*, находящимся на расстоянии нескольких нуклеотидов от полилинкеров. Для секвенирования особенно удобны парные векторы, в которых одинаковые полилинкеры противоположно ориентированы. Пример таких векторов — векторы M13mp18 и M13mp19, длина которых составляет 7249 п.н., а полилинкер длиной 54 п.н. содержит 10 сайтов рестрикции для 13 различных рестриктаз (см. рис. 7.4,з, д). Если каждый из таких векторов обработать двумя различными рестриктазами, то фрагмент чужДНК с совместимыми концами будет встроен в них в противоположных направлениях. Это позволяет определять его нуклеотидную последовательность с обоих концов по разным нитям с помощью одного и того же праймера. Конечно, можно определять нуклеотидную последовательность клонированного фрагмента с обоих концов, используя только один вектор, но для этого придется выделять РФ рекомбинантного фага и использовать два стандартных праймера (см. гл. 8).

Гибридизационные зонды готовят также с помощью стандартных праймеров, которые направляют синтез (–)-нити в среде с радиоактивными dNTP в сторону от клонируемого гена (см. рис. 7.4,з, д). Синтез осуществляют в таких условиях, которые позволяют сохранить клонируемый ген в одонитевой форме и использовать всю молекулу в качестве зонда. По результатам гибридизации зонда с двумя разными одонитевыми рекДНК, содержащими один и тот же ген, можно сделать вывод о различной (или одинаковой) ориентации этого гена в анализируемых рекДНК.

Гибридные векторы

К гибридным векторам условно относят векторы, которые сочетают в себе все или отдельные свойства плазмидных и фаговых векторов.

Фагмиды. Фагмидами называют плазмидные векторы, содержащие *ori*-сайт нитевидных фагов. Из векторов этого типа наиболее часто используются плазмиды серии pEMBL (Dente *et al.*, 1983), pUC118/119 (см. рис. 7.4,6; Vieira, Messing, 1987) и Bluescript M13 (рис. 7.8; Short *et al.*, 1988). Они образованы внедрением в векторы pUC фрагмента ДНК фага f1 или M13, содержащего сайт *pac*, необходимый для морфогенеза фаговых частиц, и сайты *ori*(+) и *ori*(-) (см. рис. 4.12). Как и при использовании векторов pUC и M13mp рекомбинантные фагмиды распознают по изменению окраски негативных колоний на чашках с X-gal.

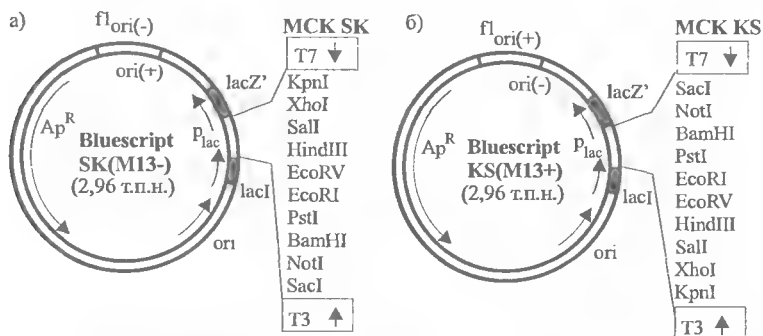


Рис. 7.8. Строение векторов Bluescript M13– (а) и Bluescript M13+ (б). Векторы M13– и M13+ отличаются направлением *ori*-сайта, взятого у фага f1, и, соответственно, тем, какая нить вектора будет упакована в фаговую корпускулу. Буквы SK (*SacI* → *KpnI*) и KS (*KpnI* → *SacI*) в названии вектора указывают на ориентацию сайта поликлонирования MCS. Стрелки в MCS указывают на направление транскрипции с фаговых промоторов T3 и T7

В присутствии фага-помощника f1 (или M13) фагмиды, используя сайт *ori*(+), начинают реплицироваться как фаговые ДНК, образуя одонитевые копии плазмид, причем выбор нити для копирования зависит от ориентации *ori*-сайта. Образовавшиеся одонитевые ДНК могут упаковываться *in vivo* в капсулу и одновременно с фагом-помощником покидать естественным путем клетку. В препаратах одонитевых ДНК, выделенных из фагов, присутствует смесь ДНК фага-помощника и фагмид. Для большинства задач (секвенирование, приготовление зондов, мутагенез и т. п.)

это не препятствие, так как для этих целей используют специфические праймеры, не соединяющиеся с ДНК фага-помощника. Доля фагмидной ДНК в препаратах зависит от структуры *ori*-сайтов фагмиды и фага-помощника. Она низка у pEMBL (1–10 %) и повышена у pUC118/119 (10–50 %).

Таким образом, с помощью фагмид клонируемый фрагмент может быть получен и использован в одно- или двунитевой форме. Их преимущество перед векторами M13mp — возможность клонирования в них относительно больших фрагментов ДНК (до 10 т.п.н.), не подвергающихся внутренним перестройкам.

Космиды. Как уже отмечалось, емкость векторов, полученных на базе ДНК фага λ (не более 23 т.п.н.), ограничена тем, что существенную их часть составляют гены, кодирующие структурные белки фага. Как выяснилось, в головку этого фага может упаковаться любая ДНК подходящего размера (36–52 т.п.н.), ограниченная двумя *cos*-сайтами, ориентированными в одном направлении. Это позволило, совместив в одном геноме плазмидный репликатор и *cos*-сайт фага λ , создать векторы нового типа, так называемые космиды (Collins, Hohn, 1978). Размер космид в среднем составляет 5 т.п.н., что позволяет с их помощью клонировать ДНК размером до 45–47 т.п.н. Поэтому космиды предназначены для конструирования банков генов.

Космиды фактически представляют собой автономные *cos*-сайты. Использование их для клонирования генов основано на том, что в линеаризованной форме они могут присоединяться к обоим концам фрагментов чужДНК и образовывать структуры типа конкатемерных молекул ДНК. Такие молекулы способны упаковываться *in vitro* в головки фага λ , если, конечно, *cos*-сайты находятся в одинаковой ориентации и размер ДНК между ними не превышает 52 т.п.н. Инъецированные в клетки рекомбинантные молекулы ДНК циркуляризируются через *cos*-сайты и автономно реплицируются. В присутствии фага-помощника они могут быть упакованы *in vivo* в фаговые головки и после лизиса клеток отобраны в виде фаговых частиц.

Обычно космиды конструируют на базе плазмиды pBR322. Техника клонирования генов с их помощью заключается в следующем. Космиду линеаризуют рестриктазой через сайт клонирования и

смешивают ее с чужДНК, подвергнутой частичному гидролизу с помощью рестриктазы, образующей одинаковые липкие концы с вектором. В результате образуются продукты разного строения (рис. 7.9). Из них к упаковке способны только такие фрагменты чужДНК, которые несут на обоих концах космиды, находящиеся в одной ориентации. Следовательно, уже на этапе упаковки осуществляется отбор рекДНК. Реконструированными *in vitro* фагами инфицируют бактериальные клетки, а клоны, содержащие рекомбинантные космиды, отбирают по селективным маркерам. При этом образуется в среднем 10^6 клонов из 1 мкг чужДНК. Несмотря на мультикопийность исходных космид, число копий рекомбинантных космид на клетку не превышает нескольких единиц. Поэтому содержащие их бактериальные клоны необходимо поддерживать в селективных условиях.

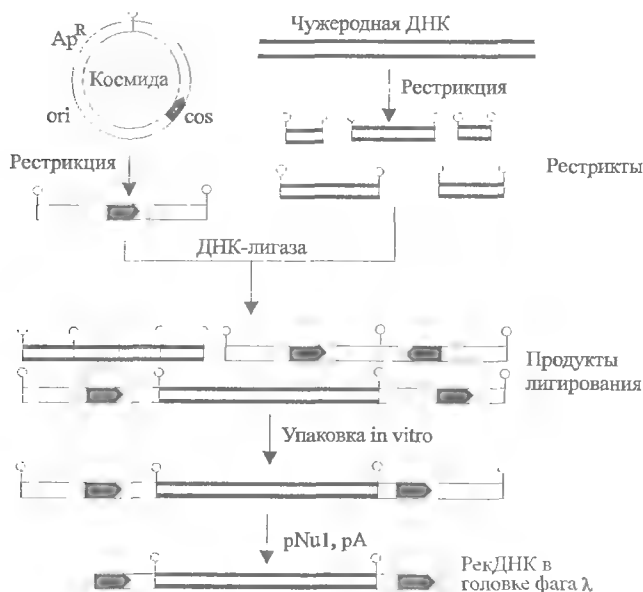


Рис. 7.9. Схема клонирования генов с помощью космиды, имеющей один *cos*-сайт
 Направление *cos*-сайта указано черной стрелкой;
 | — сайт рестрикции

Главные преимущества космид: 1) передача рекДНК в клетки инфицированием гораздо эффективнее, чем трансформацией; 2) в инфицированные клетки проникают в основном рекомбинантные молекулы ДНК; 3) происходит селекция больших клонируемых фрагментов (30—45 т.п.н.), в то время как при трансформации отбираются главным образом плазмиды меньшего размера. Последнее особенно важно при создании банка генов и при необходимости клонировать и анализировать эукариотические гены больших размеров.

Однако космидам присущи и серьезные недостатки. Первый — возможность объединения в одной рекомбинантной космиде двух или более фрагментов чужДНК, не располагающихся рядом в исходном геноме, что затрудняет правильную интерпретацию выводов о структуре генов. Во избежание этого перед клонированием необходимо дефосфорилировать фрагменты чужДНК и/или отобрать фракцию размером 30—45 т.п.н. Первый способ делает невозможным объединение фрагментов ДНК друг с другом (см. гл. 8), а второй препятствует упаковке слишком больших рекомбинантных космид. Другой недостаток — нестабильность рекомбинантных космид, причем внутримолекулярные делеции образуются даже в *recA*[−] штаммах. Он устраняется использованием клеток *E. coli recBCSbcBrecJ*. Наконец, наблюдается сравнительно высокий фон мультимерных векторных молекул, который затрудняет поиск рекомбинантных клонов. И в этом случае рекомендуется дефосфорилировать линейаризованные космиды, что предотвратит их объединение. Но как, однако, лигировать вектор и чужДНК, если оба компонента дефосфорилированы?

Наиболее просто эта проблема решается при использовании космиды с двумя одинаково ориентированными *cos*-сайтами *c2RB* (Bates, Swift, 1983). В реакции лигирования с чужДНК участвуют два разных фрагмента космиды, полученных в результате ее расщепления через единичные сайты *Bam*HI и *Sma*I (рис. 7.10). Первый сайт предназначен для клонирования геномной ДНК, частично гидролизованной рестриктазой *Sau*3A и подвергнутой действию щелочной фосфатазы. Расположенный между *cos*-сайтами сайт *Sma*I, образуя ровные концы, препятствует мультимеризации космид, так как такие концы с трудом объединяются друг с другом (чтобы исключить объединение ровных концов космидной ДНК, образованных

рестриктазой *SmaI*, реакцию с ДНК-лигазой фага Т4 ведут при высокой концентрации АТФ — 2,5 мМ). Далее в головку фага λ упаковывают рекДНК. При этом ген Km^R теряется из-за “разрезания” ДНК по *cos*-сайтам, в связи с чем отбор инфицированных клеток идет по маркеру Ap^R . Два *EcoRI*-сайта, фланкирующие *BamHI*-сайт, необходимы при использовании вектора для “прогулок по хромосоме” (см. гл. 9).

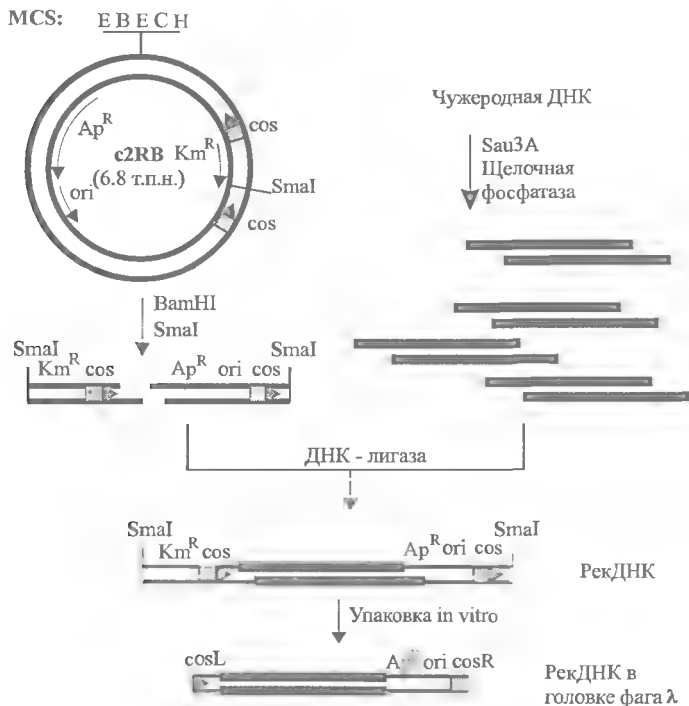


Рис. 7.10. Схема клонирования генов с помощью космиды c2RB, имеющей два *cos*-сайта.

Сайты рестрикции: В — *BamHI*, Е — *EcoRI*, Н — *HindIII*, С — *ClaI*. Направление *cos*-сайта указано черной стрелкой

Современные космиды имеют полилинкеры, по краям которых расположены сайты для редкощепящих рестриктаз с целью “вырезания” клонированных фрагментов, или фаговые промото-

ры с целью получения транскриптов с концевых участков вставок. Транскрипты используют в качестве зондов в методе “прогулки по хромосоме” (см. гл. 9). Сконструированы также космиды, содержащие эукариотические *ori*-сайты и селективные маркеры; они предназначены для работы с клетками животных (см. гл. 13). Отметим, однако, что в связи с техническими трудностями космиды применяют все реже.

Фазмиды. О природных фазмидах, сочетающих в себе свойства фагов и плазмид, уже упоминалось в гл. 4. В фазмидных векторах искусно сочетаются положительные свойства фаговых и плазмидных векторов. Один из первых таких векторов — фазмида λ рMYF131 (Янковский и др., 1987). Левое плечо этой фазмиды происходит от вектора λ 47.1AmBam, правое — от вектора λ gtWES, а между ними встроена плаزمида рUC19, линейризованная через *Bam*HI-сайт, находящийся в полилинкере (см. рис. 7.7). Размер фазмиды (33,3 т.п.н.) не допускает ее упаковки в головку фага λ , поэтому для наработки векторной ДНК используют плазмидный репликатор, а само это свойство применяют для отбора рекомбинантных фазмид в виде фаговых частиц, реконструированных *in vitro*. Емкость вектора λ рMYF131 — 4,4–19,6 т.п.н., что позволяет привлекать его для получения банков генов. Выход рекДНК достигает 3×10^6 фаговых клонов на 1 мкг векторной ДНК. Рекомбинантные фазмиды можно отбирать и в составе бактериальных клонов, инфицируя ими λ -лизогены и отбирая трансдуктанты на среде с ампициллином.

Фазмидные векторы так же как и фаговые, используют для клонирования кДНК и геномной ДНК. Эффективность упаковки рекомбинантных фазмид в фаговую головку с последующим инфицированием клеток *E. coli* превосходит эффективность трансформации бактерий плазмидами в 100 раз. Это существенно облегчает конструирование банков генов, содержащих до миллиона независимых клонов, повышая тем самым вероятность изолирования редких клонов. И сам процесс скрининга в данном случае также существенно облегчен, так как рассев фагов на чашки может проводиться с высокой плотностью, а фон “ложных ответов” обычно мал (см. гл. 9). Однако большой размер фаговых и фазмидных векторов затрудняет рестрикционный анализ клонированных генов и их секвенирование, так что после нахождения

нужного клона вставку, как правило, переносят в плазмидный вектор. Эта процедура методами *in vitro* отнимает много времени. От нее избавляет оригинальный фазмидный вектор λ ZAP (Short *et al.*, 1988), который обладает уникальной способностью исключать *in vivo* содержащуюся в нем плазмиду вместе с клонированными генами.

Вектор λ ZAP (рис. 7.7) разработан и выпускается фирмой “Стратеген”. Он используется главным образом для клонирования и экспрессии кДНК. Его сердцевина — фагида pBluescript SK(–), сконструированная на базе фагмиды pEMBL8 и плазмиды pUC19 (рис. 7.4,а). Из этих плазмид были взяты селективные маркеры *Ap^R* и *lacZ'*, причем во второй был внедрен полилинкер, фланкированный противоположно ориентированными промоторами фагов T3 и T7. Они предназначены для получения транскриптов клонированных генов с любой нити. В составе вектора λ ZAP фагида pBluescript M13SK(–) ограничена сайтами инициации и терминции репликации ДНК фага f1, которые расположены в *ori*-сайте и перекрываются в нем. Благодаря им в присутствии фага f1 (+)-нить фагмиды вместе с клонированным геном вытесняется из ДНК вектора λ ZAP с помощью белка gpII, начиная с сайта инициации репликации и кончая сайтом терминции. Далее вытесненная нить циркуляризуется и после нескольких раундов репликации упаковывается в фаговые белки. Инфицирование реципиентных клеток сформировавшимися фаговыми частицами позволяет отобрать на селективных средах клоны, содержащие рекомбинантные фагмиды. Двунитевая РФ фагмиды образуется с помощью бактериальных белков и в отсутствие фага f1 реплицируется благодаря плазмидному репликатору. Размер вектора λ ZAP 40,8 т.п.н., т. е. его емкость — 10–11 т.п.н.

Векторы для клонирования больших фрагментов ДНК

Клонирование больших (50–100 т.п.н. и более) фрагментов ДНК — важная проблема, поскольку при этом, во-первых, существенно облегчается создание геномных библиотек (см. гл. 9), а, во-вторых, удастся провести функциональный анализ полных больших генов или их комплексов. Действительно, многие гены эукариот состоят из нескольких сотен т.п.н., а своеобразным рекордсменом является ген дистрофина, чья транскрибируемая область превышает 2 млн.п.н. Поэтому в последнее десятилетие были предприняты усилия

по конструированию емких векторов. Сначала проблема была решена для дрожжевых клеток созданием искусственных хромосом YAC (см. гл. 11). Затем такие векторы были созданы на базе ДНК плазмидных профагов P1 (PAC — P1 artificial chromosome) и N15 (NAC — N15 artificial chromosome), а также F-плазмиды (BAC — bacterial artificial chromosome). Векторы pPAC и pNAC позволяют клонировать сверхкрупные, а pBAC — гигантские фрагменты ДНК (табл. 7.2). Уточним, что названия YAC, PAC, BAC и т. д. применяют для рекДНК, а сами векторы обозначают pYAC, pPAC и pBAC.

Таблица 7.2

**Возможности использования разных типов векторов
при клонировании в клетках *E. coli***

Операция	Векторы на базе ДНК				Другие векторы				
	λ	P1	N15	M13	Плазмиды	Фазмиды	Фармиды	Космиды	YAC* BAC
Клонирование сегментов ДНК:									
а) небольших (до 10 т.п.н.)	—	—	+	+	+	—	+	—	—
б) средних (10–20 т.п.н.)	+	—	+	—	+	—	—	—	—
в) крупных (20–50 т.п.н.)	—	—	+	—	—	—	—	+	—
г) сверхкрупных (50–100 т.п.н.)	—	+	+	—	—	—	—	—	+
д) гигантских (> 100 т.п.н.)	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Конструирование библиотек:									
а) геномных	+	+	+	—	—	+	—	+	+
б) кДНК	+	—	+	—	+	+	—	—	—
Экспрессия чужеродных генов	+	—	—	+	—	+	+	—	—
Секвенирование	—	—	—	+	+	—	+	—	—
Синтез гибридизационных зондов	+	**	—	+	+	**	+	—	—
Секреция чужеродных белков	—	—	—	—	+	—	—	—	—

* Дрожжевой вектор.

** При наличии фагоспецифических промоторов.

Векторы pNAC — пока единственные линейные прокариотические векторы. При клонировании больших фрагментов ДНК линейные векторы обладают преимуществом перед кольцевыми векторами, так как эффективность образования рекДНК в этом случае выше (Янковский, 1989). В то же время следует учитывать, что в процедурах выделения большие линейные молекулы ДНК более ломки, чем кольцевые.

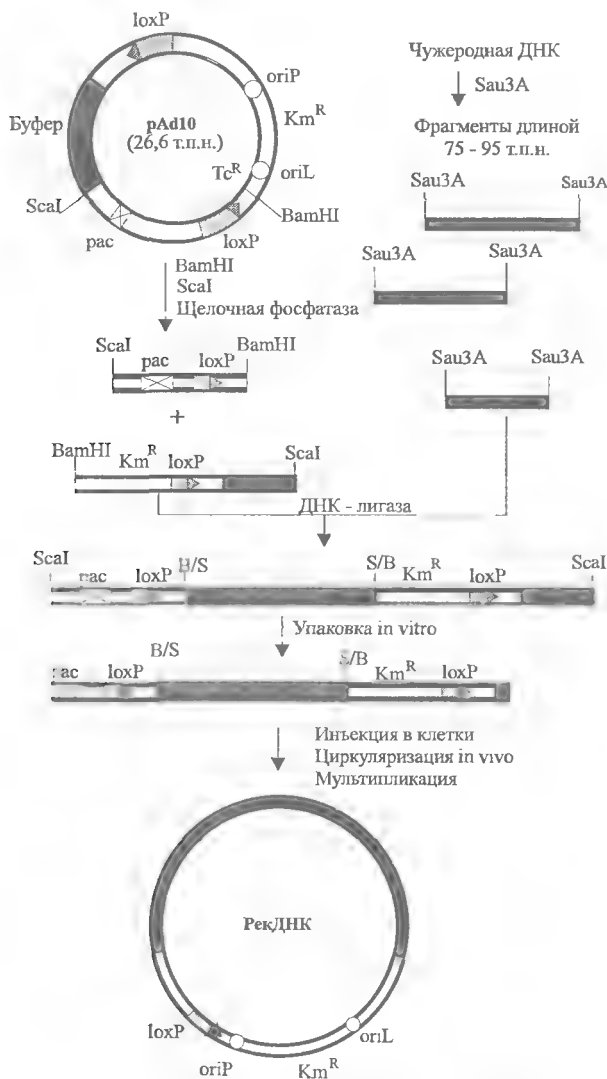


Рис. 7.11. Схема клонирования больших фрагментов ДНК с помощью вектора pAd10.
B/S — рекомбинантный сайт *Bam*HI/*Sau*3A.
Направление *loxP*-сайта указано черной стрелкой

Отметим важную особенность репликонов, использованных для создания вышеупомянутых векторов: все они малокопийны. Это вызвано необходимостью обеспечить стабильность клонируемой ДНК. Известно, что с увеличением ее размера увеличивается вероятность ее структурных перестроек (делеции, вставки, инверсии). Вероятность повышается по мере увеличения числа копий рекДНК, поскольку все более сказывается эффект межмолекулярной рекомбинации.

РАС-клонирование. Профаг фага P1 (размер ДНК около 90 т.п.н.) стабильно реплицируется в виде низкокопийной кольцевой плазмиды. Размер области генома, отвечающей за плазмидную репликацию, сравнительно невелик (несколько т.п.н.), а емкость фаговой головки значительна (110—115 т.п.н.). Это дало возможность сконструировать на базе P1 ДНК плазмидные векторы с емкостью до 100 т.п.н., способные совместно с клонированной в них чужДНК упаковываться в головки фага P1 (Sternberg, 1990). Базовый вектор pAd10 состоит из двух областей, разделенных *loxP*-сайтами, на которые действует сайт-специфическая рекомбиназа Cre (рис. 7.11). Одну область составляют *ori*-сайт плазмиды pBR322, единственный сайт *SacI*, буферный фрагмент из аденовирусной ДНК и локус *pac*, ответственный за упаковку P1 ДНК. В другой области находятся плазмидный и литический репликаторы фага P1, селективные маркеры *Km^R* и *Tc^R* и единичные сайты рестрикции *Bam*HI и *Sal*I (в гене *Tc^R*). Плазмидный репликатор делает вектор малокопийным, а литический репликатор, находящийся под контролем Lac-репрессора, при активации повышает число копий в клетке до 20.

Клонирование с помощью P1-вектора осуществляется следующим образом. Векторную ДНК обрабатывают рестриктазами *Bam*HI и *Sac*I, а также щелочной фосфатазой для предотвращения лигирования двух образовавшихся векторных плеч (их размер 2,6 и 24 т.п.н.). Далее к ней добавляют геномную ДНК, частично гидролизованную рестриктазой *Sau*3A и фракционированную до среднего размера 75—95 т.п.н. Объединение рестриктов происходит по липким *Bam*HI/*Sau*3A концам, так что плечи P1-вектора присоединяются к обоим концам клонируемой ДНК. Упаковку рекДНК ведут в две стадии. Сначала ее “разрезают” в сайте *pac* ферментом паказой (он содержится в экстракте дефектного P1-лизогена), а

затем добавляют упаковочную смесь, содержащую головки и отростки фага Р1. ДНК упаковывается, начиная с *pac*-сайта, а момент окончания процесса упаковки подсказывается (в отличие от фага λ) заполнением всего объема головки, в результате чего оставшаяся часть ДНК “отрезается” между произвольными нуклеотидами. Реконструированными *in vitro* фагами инфицируют клетки, содержащие фаговый ген *cre*. Продукт этого гена закольцовывает инъецированную линейную ДНК, если только в ней сохранились после упаковки оба *loxP*-сайта. Это делает возможной репликацию рекДНК, обеспечивая выход Km^R -трансформантов до 10^5 клонов на 1 мкг добавляемой ДНК (вектор + вставка). Ген Tc^R в рекДНК инактивирован.

Линейные векторы на базе плазмиды N15. Профаг умеренного колифага N15 имеет уникальную структуру: он является линейной малокопийной плазмидой с концевой шпилькой, замыкающей ковалентно обе нити ДНК (Сварчевский, Рыбчин, 1984). В центральной части генома плазмиды N15 находятся гены, ответственные за морфогенез фаговой частицы. Удаление этих генов, ненужных для стабильного поддержания плазмиды, позволяет уменьшить ее длину с 46,3 до 13,6 т.п.н. В миниплазмиды N15 были введены селективные маркеры, содержащие единственные сайты рестрикции, что впервые привело к созданию линейных плазмидных векторов (Востров и др., 1992, рис. 7.12; Равин, Равин, 1994). Клонирование ведут стандартными методами. Тестируемая емкость этих векторов — 50 т.п.н., но, предположительно, она может быть повышена до 100 т.п.н. и более.

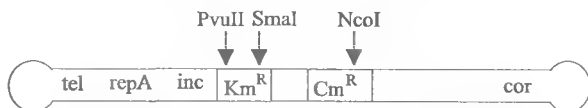


Рис. 7.12. Строение линейного вектора pLV3, сконструированного на базе репликатора плазмиды N15.

Функции генов и обозначения см. на рис. 3.17

ВАС-клонирование. Идея использовать F-плазмиду для клонирования больших фрагментов ДНК основана на хорошо известном факте существования F'-плазмид (см. гл. 3) размером до 1 млн.п.н. Векторы рВАС содержат ген *repE* и сайт *oriS*, которые

обеспечивают его одностороннюю репликацию и контроль числа копий, а также гены *parAB* и сайт *parC*, ответственные за распределение плазмидной ДНК по дочерним клеткам (см. гл. 3, рис. 3.7). Первый такой вектор, pBAC108L, был снабжен маркером *Cm^R* и клонирующим сегментом (рис. 7.13). Последний включал в себя: 1) сайты λ *cosN* и P1 *loxP* для разрезания рекДНК в определенных положениях с помощью белков λ Ter или P1 Cre с целью ее физического картирования; 2) сайты *Hind*III и *Bam*HI для клонирования ДНК; 3) сайты (*Not*I, *Sfi*I, *Sma*I и др.) для вырезания вставок (Shizuya *et al.*, 1992). Клонированные сайты фланкированы промоторами фагов T7 и SP6, которые позволяют синтезировать РНК-зонды для “прогулок по хромосоме” и предоставляют возможность секвенировать ДНК на стыках вектор—вставка с помощью универсальных праймеров.

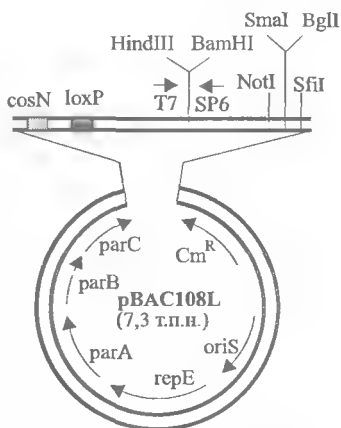


Рис. 7.13. Строение вектора pBAC108L, сконструированного на базе репликатора плазмиды F

ВАС-клонирование ведут следующим образом. Векторную ДНК обрабатывают рестриктазой *Bam*HI или *Hind*III, а также щелочной фосфатазой для предотвращения ее рециркуляризации (см. гл. 8). Далее к ней добавляют геномную ДНК, частично гидролизованную той же рестриктазой и фракционированную до среднего размера 100—300 т.п.н. Молярное соотношение вектор : чужДНК при лигировании (400 единиц ДНК-лигазы фага T4, 12 ч при 16 °C) равно 10:1. Трансформацию ведут электропорацией, для чего используют клетки DH10B (см. табл. 7.1); трансформанты отбирают по их устойчивости к хлорамфениколу. В типичном эксперименте образец, содержащий около 50 нг чужДНК, позволяет получать 100—1000 трансформантов.

Существенное преимущество ВАС-клонирования по сравнению с YAC-клонированием — структурная стабильность вставок, а также повышенная в 10—100 раз частота трансформации, что позволяет экономить геномную ДНК.

Векторы-транспозоны

Иногда желательно, чтобы чужДНК находилась в составе клеточной хромосомы. Например, если клетки (скажем, *Pseudomonas* или *Rhizobium*) предназначены для использования в природных условиях, то интеграция клонируемого гена в хромосому позволяет предотвратить опасность его “утечки” в другие виды бактерий. Или, допустим, изучается регуляция клонируемого гена. Тогда важно, чтобы он стабильно поддерживался в клетке в единственном числе. В таких случаях в качестве переносчика генов применяют модифицированные транспозоны, которые в свою очередь переносятся в клетки подходящими плазмидами или фагами. Векторам, которые переносят транспозоны, придают способность к “самоубийству”, т. е. после цикла клеточного деления эти векторы элиминируются. Известно довольно много способов “самоубийства”: термочувствительный характер репликации, включение гена-киллера (например, ген *kil* у фага λ) и т. д. У векторов-транспозонов удаляют гены транспозаз, лишая их тем самым способности к самостоятельным перемещениям. На их место вставляется чужДНК. Сами гены транспозаз внедряют в векторы-носители транспозонов; именно с их помощью транспозоны переносятся в клеточный геном. После “самоубийства” векторов-носителей рекомбинантный транспозон остается локализованным в определенной точке клеточного генома.

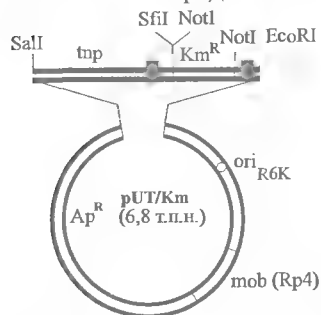


Рис. 7.14. Строение вектора-транспозона mini-Tn5-Km и плазмиды-носителя pUT/Km. Границы мини-транспозона выделены черным прямоугольником

Большая серия векторов — мини-транспозонов Tn5, Tn10, Mu и других описана в руководстве Миллера (Miller, 1992). В качестве примера приведем плазмиду pUT/Km (6,8 т.п.н.), несущую транспозонный вектор mini-Tn5-Km (рис. 7.14). У транспозона делегированы гены *Sm^R* и *Bm^R* (см. табл. 2.2), а ген транспозазы *tnp* вынесен за пределы концевых инвертированных повторов, состоящих из 19 п.н. Образовавшаяся конструкция через сайты *SalI* и *EcoRI* внесена в плазмидный вектор-носитель, в котором репликатор взят из плазмиды R6K, а ген *mob* (обеспечение

мобилизации) — из плазмиды RP4. Эта плазида используется для переноса мини-транспозона конъюгацией из *E. coli* в клетки *Pseudomonas*. В них плазида pUT не реплицируется, и поэтому конъюганты, отобранные по маркеру Km^R , содержат только транспозон, интегрированный в бактериальную хромосому. Сконструированы многочисленные варианты, в которых транспозонный вектор содержит другие селективные маркеры (включая гены *lux*), разные полилинкеры, гены-репортеры для поиска промоторов и для образования рекомбинантных белков, локусы *mob* для придания плазмидам-мишеням свойства к мобилизации и т. д.

ДРУГИЕ СИСТЕМЫ КЛОНИРОВАНИЯ

Необходимость в разработке других систем клонирования кроме клеток *E. coli* продиктована главным образом желанием использовать для производства генно-инженерных продуктов традиционные промышленные микроорганизмы. К ним в первую очередь относятся грамположительные виды бактерий, синтезирующие различные хозяйственно важные вещества: бациллы (протеазы и амилазы), актиномицеты (антибиотики) и коринебактерии (аминокислоты, стероиды). Из грамотрицательных клеток отметим псевдомонады, способные вести биodeградацию органических отходов.

Векторы, предназначенные для работы в других (кроме *E. coli*) системах клонирования, делают, как правило, челночными, придавая им способность реплицироваться дополнительно и в клетках *E. coli*. Это дает возможность использовать хорошо изученную систему для начальных этапов конструирования рекДНК и ее размножения в количествах, достаточных для трансформации исследуемых бактерий, а уже экспрессию клонированных генов вести в исследуемой системе. Основная трудность при разработке новых систем клонирования — отсутствие надежного способа введения ДНК в клетки. Плазмиды могут просто не проникать в клетку или разрушаться в ней клеточными системами рестрикции, они могут не обнаруживаться из-за отсутствия экспрессии репликационных или селективных генов.

Векторы грамотрицательных бактерий. Применение описанных ранее векторов ограничено клетками *E. coli* и такими

близкородственными им энтеробактериями, как *Salmonella*, *Proteus* и *Serratia*. Векторы для других грамотрицательных бактерий конструируют, используя плазмиды с широким кругом хозяев, относящихся к группам несовместимости P, Q и W. Как уже отмечалось (см. гл. 3), эти плазмиды реплицируются почти во всех грамотрицательных бактериях, включая промышленно важные штаммы *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Methylophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rizobium* и др. Наиболее характерные представители перечисленных групп — плазмиды RP4 (см. рис. 3.13,а), RSF1010 (см. рис. 3.13,б) и Sa (29,6 т.п.н.), соответственно. Плазмида RP4 имеет единственные сайты рестрикции в своих селективных генах Ap^R и Km^R , но из-за большого размера не используется в качестве вектора. Вектором является, например, ее производная плазмида pRK2501 (рис. 7.15,а), у которой есть сайты клонирования в генах Km^R (*Xho*I и *Hind*III) и Tc^R (*Sal*I), а также единственные сайты *Eco*RI и *Bgl*II. У этого вектора отсутствует способность к конъюгации и мобилизации, поэтому его перенос возможен только методом трансформации (Thomas *et al.*, 1981).

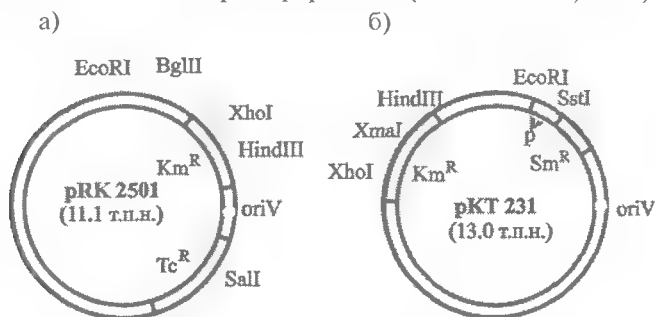


Рис. 7.15. Строение векторов pRK2501 и pKT231, сконструированных на базе плазмид с широким кругом хозяев RP4 (а) и RSF1010 (б)

Плазмида RSF1010 мультикопийна, неконъюгативна и невелика по размеру, но в ее селективных маркерах нет единственных сайтов рестрикции, поэтому она неудобна для клонирования генов. Для этой цели применяют ее производные, из которых первыми были предложены векторы серии pKT. Чаще всего используют вектор pKT231 (рис. 7.15, б), содержащий единственные сайты рестрикции *Xho*I, *Xma*I и *Hind*III в гене Km^R (взяты из транспозона Tn601/903), а также *Eco*RI и

*Sst*I в промоторной области гена *Sm^R*. Вектор pKT249, имеющий селективные маркеры *Ap^R*, *Su^R* и *Sm^R* и сайты клонирования *Eco*RI и *Sst*I, является космидой, и поэтому для первичного отбора рекДНК используют клетки *E. coli* (Bagdasarian *et al.*, 1981).

Преимущество описываемых векторов состоит в том, что нет необходимости делать их челночными. С их помощью вначале можно осуществлять предварительные операции по клонированию в хорошо изученных генетических системах (например, *E. coli*, *P. putida*), а затем отобранными клонами рекДНК проводить трансформацию клеток других видов. Недостаток этих векторов — их нестабильность, которая вызвана тем, что гены, отвечающие за стабильность, разбросаны по всему плазмидному геному (см. гл. 3) и часть из них отсутствует в векторах. Другой недостаток — разный уровень экспрессии плазмидных генов в разных клетках, что влияет на число копий плазмид, уровень синтеза чужеродного продукта и на эффективность выражения селективных маркеров.

Конечно, конструируют и челночные векторы. Например, вектор pUCP18, сконструированный на базе плазмиды pUC18 и репликатора одной из плазмид *P. aeruginosa*, стабильно поддерживает в кишечной палочке и клетках псевдомонас (Schweizer, 1991).

Большинство граммотрицательных клеток можно трансформировать после их обработки на холоду хлористым кальцием, но достигнутая эффективность трансформации существенно ниже, чем у *E. coli*. Используют также трансформацию протопластов в присутствии полиэтиленгликоля. Но наиболее универсален метод электротрансформации (см. с. 203).

Векторы *Bacillus subtilis*. Клетки *B. subtilis*, будучи почвенными микроорганизмами, обладают хорошо развитым аппаратом секреции продуктов метаболизма и выделяют в ростовую среду такие промышленно важные ферменты, как, например, амилазы, β -лактомазы, протеазы и др. Секреция чужеродных белков существенно облегчает их выделение и очистку, а, кроме того, иногда являются единственным средством их спасения от деградации внутри клетки.

При создании системы клонирования для *B. subtilis* первоначальные трудности были связаны с тем, что большинство ее плазмид не несет селективируемых признаков. Однако оказалось (Ehrlich, 1977), что некоторые мультикопийные плазмиды золотистого стафилококка, содержащие гены устойчивости к различным

антибиотикам, способны трансформировать клетки *B. subtilis*, стабильно в них реплицироваться и экспрессировать эти гены. К ним относятся плазмиды pUB110 (4,5 т.п.н.; Km^R ; см. рис. 3.15), pE194 (3,7 т.п.н.; Em^R), pC194 (2,8 т.п.н.; Cm^R) и pT127 (4,5 т.п.н.; Tc^R). Кроме селективных маркеров эти плазмиды обладают единственными сайтами рестрикции и поэтому иногда используются в качестве векторов. Однако, как уже указывалось, удобные для работы векторы имеют два селективных маркера, причем хотя бы в одном из них должен содержаться единственный рестрикционный сайт. Такие векторы были созданы на основе ряда вышеперечисленных плазмид. Так, вектор pHV11 с сайтом клонирования *KpnI* сконструирован внедрением *HindIII*-фрагмента плазмиды pT127, содержащего маркер Tc^R , в плазмиду pC194 через ее единственный *HindIII*-сайт (рис. 7.16, а). Вектор pPL608 представляет собой плазмиду pUB110, в которую вставлен ген *cat* (Cm^R) из хромосомы *B. pumilus* (рис. 7.16, б). Экспрессия этого гена зависит от промотора фага *B. subtilis* SP02, вставленного рядом через *EcoRI*-сайт. Данный вектор имеет в гене *cat* единственные сайты рестрикции — *PstI* и *HindIII*. Это позволяет отыскивать среди неомицинустойчивых клеток клоны, содержащие рекДНК, по их чувствительности к хлорамфениколу. Интересно отметить, что в данной конструкции промотор SP02 стал индуцироваться в присутствии хлорамфеникола. Можно также индуцировать экспрессию внедренного через *HindIII*-сайт чужеродного гена, хотя ген *cat* при этом будет инактивирован.

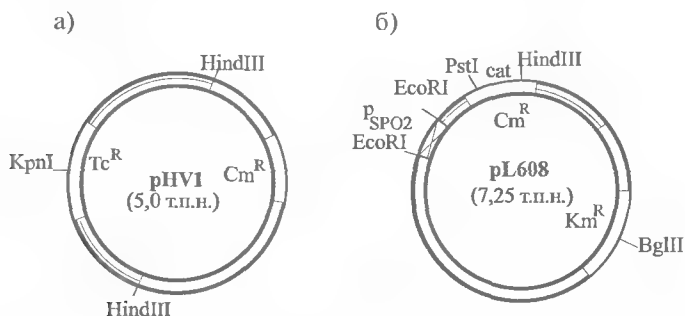


Рис. 7.16. Строение векторов pHV11 и pPL608, сконструированных на базе плазмид pC194 (а) и pUB110 (б) и предназначенных для клонирования в клетках *B. subtilis*

Челночные векторы, способные реплицироваться в клетках *E. coli* и *B. subtilis*, были впервые сконструированы Эрлихом (Ehrlich, 1978) и в лаборатории Степанова (Йомантас и др., 1979). Через единственные сайты *Hind*III плазмида pBR322 была объединена в первом случае с плазмидой pC194 (получен вектор pHV14), а во втором — с плазмидой pUB110 (получен вектор pJJ10). Эти плазмиды трансформируют оба типа клеток, однако экспрессия их генов неравнозначна. Гены *Sm^R* и *Km^R* бациллярных плазмид проявляются как в *E. coli*, так и в *B. subtilis*, а ген *Ap^R* экспрессируется только в естественном хозяине — в *E. coli*. Это явление вызвано большей специфичностью бациллярного аппарата транскрипции-трансляции (см. гл. 10).

Недостатком ранних векторов была их функциональная и структурная нестабильность. Функциональная нестабильность была вызвана тем, что использовались репликаторы, не специфичные для *B. subtilis*. Репликатор, взятый из криптической бациллярной плазмиды pTA1060, существенно повысил стабильность векторов (Haima et al., 1987). Бирепликонный вектор pHP13 обладает всеми признаками современных векторов (рис. 7.17,а). Блок генов из плазмиды pUC9 позволяет ему реплицироваться в клетках *E. coli* и вести в них поиск клонов, содержащих рекДНК, по эффекту α -комплементации. Селективные маркеры *Sm^R* и *Em^R* взяты из плазмид pC194 и pE194, соответственно, поэтому они экспрессируются в обоих видах клеток. Единственные сайты *Nco*I и *Bcl*II позволяют вести отбор рекомбинантов по инактивации этих маркеров. Число плазмидных копий в клетках *B. subtilis* — 5, а в *E. coli* — около 200. На основе вектора pHP13 сконструирован вектор прямой селекции pHP59, который позволяет отбирать трансформанты *B. subtilis*, содержащие только рекДНК (Haima et al., 1990). Дополнительный элемент у этого вектора — конститутивно экспрессирующийся ген *caf86* из хромосомы *B. pumilus*, который находится в одной трансляционной рамке с фрагментом *lacZ'* (рис. 7.17,б) и поэтому обеспечивает в клетках *B. subtilis* синтез функционального α -пептида β -галактозидазы в составе гибридного белка. Реципиентный штамм *B. subtilis* 6GM15 содержит мутантный ген *lac* Δ M15 под контролем бациллярного промотора, что дает возможность использовать в этих клетках полилинкер MCS для клонирования и отбора клонов с рекДНК по эффекту α -комплементации.

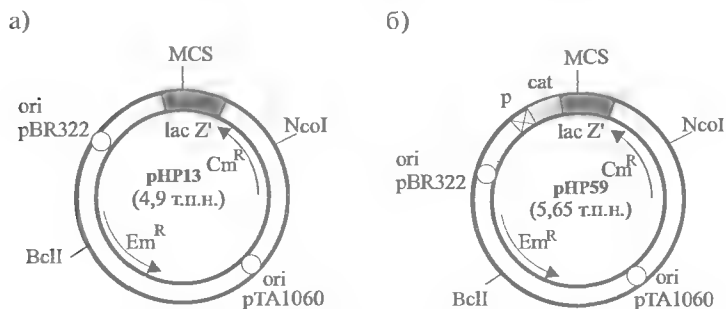


Рис. 7.17. Строение бирепликонных векторов pHP13 (а) и pHP59 (б), предназначенных для клонирования в клетках *B. subtilis* и *E. coli*

Структурная нестабильность (появление делеций в клонируемой ДНК) — следствие способа репликации использовавшихся плазмид. Репликация по механизму катящегося кольца сопровождается образованием однонитевых ДНК (см. рис. 3.15), а такая ДНК рекомбиногенна. Выделение реплицирующихся в тета-форме плазмид pAMβ1 из *S. faecalis* и pTB19 из *B. subtilis* позволило создать на основе их репликаторов векторы, стабильно клонирующие ДНК размером до 33 т.п.н. (Janniere *et al.*, 1990).

На базе ДНК умеренного фага F105 (39,2 т.п.н.) сконструированы фаговые векторы, позволяющие клонировать чужДНК размером до 5 т.п.н. (Jones, Errington, 1987) и экспрессировать их (Gibson, Errington, 1992). Принципы конструирования и способы клонирования сходны с теми, которые описаны для фага λ.

Трансформация клеток *B. subtilis*. Как уже отмечалось, трансформируемость клеток *B. subtilis* — их природное свойство, поэтому они легко трансформируются гомологичной бактериальной ДНК. Добавленная двунитевая ДНК адсорбируется на поверхности компетентных клеток и под действием нуклеаз превращается в однонитевые фрагменты. В клетки проникает однонитевая ДНК размером около 10^4 нуклеотидов, которая путем рекомбинации замещает однонитевой гомологичный участок хромосомной ДНК, при этом почти каждый поглощенный фрагмент ДНК интегрируется в хромосому. Частота трансформации линейно зависит от концентрации добавляемой ДНК в определенных ее пределах. Это

свидетельствует о том, что одной молекулы ДНК достаточно для успешной трансформации клетки.

Начальные этапы процесса трансформации клеток бактериальной и плазмидной ДНК одинаковы, но во втором случае эффективность трансформации (нефракционированными препаратами плазмид) падает в среднем на три порядка, причем она оказалась зависящей от степени олигомеризации плазмид (Canosi *et al.*, 1978). Так, для мономерных кольцевых молекул она равна 40 трансформантам на 1 мкг ДНК, для димерных — 10^4 , а для мультимерных — более 10^5 . Это объясняется тем, что проникшие в клетки одонитевые линейные фрагменты мономерной плазмидной ДНК не могут образовывать двунитевые кольцевые молекулы, способные к репликации.

Указанный недостаток устраняется использованием для трансформации мультимерных плазмид или созданием *in vivo* условий для закольцовывания мономерных одонитевых ДНК. В первом случае успешная трансформация обеспечивается повышенной вероятностью попадания в трансформируемую клетку таких одонитевых фрагментов, которые содержат перекрывающиеся и комплементарные области плазмидной ДНК. Это может привести к образованию хотя бы частично дублированных кольцевых молекул, способных к репликации, и к восстановлению целого или укороченного плазмидного генома. Мультимерные формы плазмид получают лигированием смеси линеаризованных мономерных молекул. Во втором случае эффект (до 2×10^6 трансформантов на 1 мкг ДНК) достигается наличием в плазмиде дублированного участка (Бойцов, Голубков, 1980) или участка, гомологичного бактериальной ДНК, а также присутствием в клетке другой плазмиды, имеющей область гомологии с трансформирующей плазмидой. В каждом из трех вариантов этого случая создаются условия для рекомбинационного объединения концов линейных одонитевых фрагментов, для последующего синтеза комплементарной нити и образования нативной плазмидной ДНК. Разумеется, в этом случае для трансформации можно использовать только Rec^+ клетки.

В качестве реципиентов можно использовать протопласты *B. subtilis*, так как у грамположительных бактерий эффективно

регенерируется клеточная стенка благодаря относительной простоте ее строения. Трансформацию протопластов *B. subtilis* плазмидной ДНК впервые осуществили Чанг и Коэн (Chang, Cohen, 1979). Как выяснилось, протопласты эффективно (до 4×10^6 трансформантов на 1 мкг ДНК) трансформируются в присутствии полиэтиленгликоля плазмидной ДНК любой формы, в том числе и мономерными молекулами. Это указывает на различие механизмов проникновения ДНК в клетку при трансформации бактерий и их протопластов. Однако техника получения протопластов сложнее, чем компетентных клеток, в связи с чем трансформацию протопластов применяют только в необходимых случаях. Например, если клетки дефектны по системам рекомбинации или слишком мал выход мультимерных плазмидных ДНК в реакции лигирования и т. п.

Векторы *Streptomyces*. Грамположительные почвенные бактерии рода *Streptomyces* производят свыше 60 % известных антибиотиков и обладают собственными плазмидами и фагами. Неудивительно поэтому, что для этих клеток достигнут существенный прогресс в разработке систем клонирования. Векторы обычно конструируют на базе низкокопийных плазмид SCP2 (30 т.п.н. из *S. coelicolor*) и SLP1 (17 т.п.н. из *S. lividans*), а также мульткопийной плазмиды pIJ101 (8830 п.н.). Все плазмиды конъюгативны. Однако у мульткопийных плазмидных векторов гены, отвечающие за конъюгативность, обычно делетированы, чтобы избежать возможности неконтролируемого обмена рекомбинантными ДНК между клетками в смеси трансформантов. В качестве селективных маркеров используют гены, обеспечивающие устойчивость клеток к различным антибиотикам. Наиболее распространенным маркером является ген *tet*^r (устойчивость клеток к тиострептону).

Для клонирования в стрептомицетах сконструированы различные типы векторов: клонирующие, экспрессионные, космидные, интегративные и др. (см. обзор Wohlleben, Muth, 1993). В частности, вектор pIJ486 (около 100 копий на клетку; рис. 7.18,а) предназначен для клонирования и экспрессии генов стрептомицетов, имеющих собственный промотор (Ward *et al.*, 1986).

С целью прямой селекции искомым трансформантов гены внедряют без собственного терминатора транскрипции в полилинкер,

расположенный перед геном *neo* (устойчивость к канамицину), у которого нет промотора. Внедрение осуществляют в одинаковом направлении с геном *neo*. Селекцию ведут по признаку устойчивости трансформантов к канамицину, так как благодаря последовательности Шайна—Далгарно, находящейся в конце полилинкера, в клетках, содержащих рекДНК, ген *neo* экспрессируется. В клонирующих векторах (например, pIJ702, рис. 7.18, б) для поиска рекомбинантных плазмид обычно используют ген тирозиназы *mel*, инактивация которого приводит к изменению окраски колоний трансформантов.

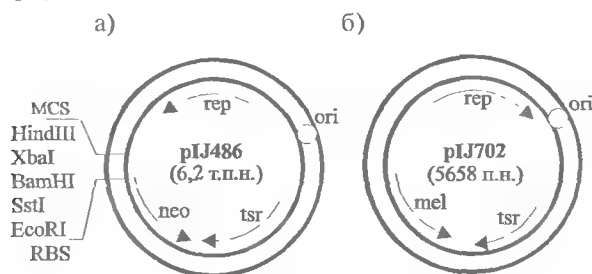


Рис. 7.18. Векторы стрептомицет pIJ486 (а) и pIJ702 (б).
Репликатор (*rep*, *ori*) взят из плазмиды pIJ101

Плазмидные векторы *Streptomyces* делают, как правило, целочными, чтобы все предварительные операции по клонированию осуществлять в клетках *E. coli*. Второй репликатор берут обычно из плазмиды pACYC184, так как он более стабилен в клетках стрептомицетов, чем репликатор pBR322. Стрептомицеты обладают мощными системами рестрикции и разрушают ДНК, вводимую из *E. coli* или из других стрептомицетов. Поэтому в качестве реципиента чужДНК наиболее приемлем безрестриктазный штамм *S. lividans* 66.

Фаговые векторы стрептомицетов конструируют главным образом на базе ДНК умеренного фага pC31 (41,4 т.п.н.). Значительная часть его генома (до 10 т.п.н.) может быть удалена и использована для целей клонирования без нарушения его способности к вегетативному развитию. В фаговые головки упаковывается ДНК размером от 36 до 43 т.п.н., поэтому максимальная емкость

фаговых векторов (с учетом присутствия в них селективных маркеров и полилинкера) равна 9–10 т.п.н.

Кроме электротрансформации для введения ДНК в клетки стрептомицетов используют трансформацию их протопластов в присутствии полиэтиленгликоля. Эффективность этого процесса — около 10^7 трансформантов на 1 мкг суперскрученной плазмидной или линейной фаговой ДНК. В опытах по клонированию эта величина падает на два–четыре порядка.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЕКТОРОВ

Для клонирования генов в клетках *E. coli* применяют векторы, сконструированные на базе ДНК плазмид и фагов, а также векторы, сочетающие в себе их свойства (фазмиды, фагмиды и космиды). В силу различных биологических и физических характеристик различные векторы используют для разных целей (табл. 7.2).

Плазмидные векторы наиболее универсальны. В мульткопийных плаزمидях клонируют, как правило, фрагменты ДНК небольших размеров (до 10 т.п.н.), в малокопийных — средних (до 30–40 т.п.н.) и больших (50–100 т.п.н. и выше) размеров. Ограничение по длине клонируемых фрагментов ДНК вызвано главным образом низкой эффективностью трансформации клеток образующимися рекДНК. Для введения больших фрагментов ДНК в бактериальные клетки используют метод их предварительной упаковки в фаговые головки (например, PAC-клонирование) или метод электротрансформации (BAC-клонирование), а для переноса в клетки животных предложены другие способы (см. гл. 13).

Векторы, основанные на использовании ДНК фага λ или его *cos*-сайта, имеют емкость до 22 (фаговые векторы и фазмиды) и даже 45 т.п.н. (космиды). Они практичны в работе, и поэтому их используют для создания геномных библиотек (см. гл. 9). Клонирование и анализ небольших фрагментов ДНК в них менее эффективны.

Векторы, использующие репликаторы нитевидных фагов, применяют для получения одонитевых фрагментов ДНК с целью их секвенирования или приготовления гибридизационных зондов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОВТОРЕНИЯ И ОБСУЖДЕНИЯ

7.1. Почему встроенный фрагмент чужДНК в вектор EMBL3 нельзя “вырезать” с помощью рестриктаз *Bam*HI или *Sau*3A?

7.2. В векторах pBR313 и pBR322 имеется ген *Tc^R*, но в гибридных векторах он не экспрессируется. Почему?

7.3. При получении рекДНК, основанной на ДНК фага λ , сначала объединяются плечи вектора через *cos*-сайты и только затем к ним присоединяется чужДНК. Почему?

7.4. В каких случаях можно использовать бактериальный штамм *hfl* для прямой селекции рекДНК при работе с λ -векторами?

7.5. Можно ли при работе с вектором λ Ch4A использовать клетки *recA* и проводить отбор рекомбинантов по *Spⁱ-*фенотипу?

7.6. Объясните, почему рекДНК, конструируемая при РАС-клонировании, содержит разные плечи вектора и нет комбинаций с двумя малыми или двумя большими плечами?

7.7. Какие факторы являются определяющими при выборе клонирующего вектора?

7.8. В каких областях исследования полезны линейные плазмидные векторы?

7.9 В каких векторах и для чего используются элементы ДНК нитевидных фагов?

7.10. В чем заключаются особенности клонирования больших фрагментов ДНК и какие векторы для этого применяют?

Глава 8

ОПЕРАЦИИ НА ДНК

Возможны многочисленные операции на ДНК *in vitro* в зависимости от цели их дальнейшего использования. В генетической инженерии основная процедура — клонирование ДНК, проводимое для создания банка генов всего генома (геномной библиотеки), для получения банка генов отдельной хромосомы или ее части (частичной геномной библиотеки; такие банки называют также клонотеками) и, кроме того, для конструирования рекДНК, содержащей определенный ген. В белковой инженерии для получения модифицированных форм белков или пептидов сначала синтезируют кодирующие их фрагменты ДНК. С развитием методов генной инженерии реальным стал направленный мутагенез, вытесняющий при изучении тонкой структуры гена классические методы мутирования. С помощью этой техники возможна плановая замена в белке одной аминокислоты на другую, что облегчает изучение механизмов катализа, субстратной специфичности ферментов, стабильности полипептидов и т. д. К операциям на ДНК относят также ее выделение из клеток, фрагментацию, фракционирование и очистку отдельных фрагментов, формирование у заданного фрагмента ДНК концов нужной структуры и его объединение с вектором, физическое картирование ДНК и т. д. Большинство этих операций контролируется или выполняется с использованием методом электрофореза в геле (см. приложение).

Здесь нет возможности описывать все эти методы. Стандартные протоколы описаны в пособиях Sambrook *et al.*, 1989 (русский перевод первого издания Маниатис и др., 1984); “Клонирование ДНК. Методы”, 1988; “Новое в клонировании ДНК. Методы”, 1989; “Плазмиды. Методы”, 1990; “Методы молекулярной генетики и генной инженерии”, 1990; Perbal, 1988; “Recombinant DNA methodology”, 1989; Zyskind, Bernstein, 1989.

Подготовка фрагментов ДНК для клонирования

Фрагменты ДНК, предназначенные для клонирования, получают химическим и ферментативным синтезом, гидролизом клонируемой ДНК рестриктазами и другими эндонуклеазами, дроблением ее гидродинамическим способом или ультразвуком. Подбором условий в определенных пределах можно задавать их длину, но в ряде случаев в зависимости от емкости векторов и необходимости их эффективного использования фрагменты ДНК перед клонированием фракционируют по размеру. Образующиеся двунитевые фрагменты ДНК обладают разными концами, что определяет выбор метода их присоединения к векторным молекулам. Если фрагменты синтезированы или получены воздействием рестриктаз, концы их могут быть ровными (тупыми) или липкими. Фрагменты, полученные в результате неспецифического дробления ДНК, имеют на концах случайные однонитевые участки. При этом разрывы распределяются по молекулам случайно, так что среди образовавшихся фрагментов ДНК всегда содержится любой из генов в неповрежденном виде. Это особенно важно при создании банка генов. Расщепление ДНК рестриктазами, естественно, носит неслучайный характер. Если в клонируемом гене имеется сайт узнавания используемой рестриктазы, то ведут ограниченный гидролиз ДНК, чтобы не разрушить этот ген.

Для получения полной или частичной геномной библиотеки проводят тотальное (валовое) клонирование всех выделенных фрагментов ДНК. Такой способ клонирования называют также шотган (shot-gun)-экспериментом. В случае же конструирования рекДНК, содержащей определенный ген с некоторыми известными характеристиками, фрагменты ДНК, получаемые под действием рестриктаз, разделяют с помощью электрофореза в агарозном или полиакриламидном гелях. Если размер фрагмента, несущего нужный ген, неизвестен, его находят методом гибридизации по Саузерну (см. приложение). Для этого разделенные фрагменты ДНК переносят из геля на нитроцеллюлозный фильтр, гибридизуют с радиоактивным РНК- или ДНК-зондом к нужному гену и подвергают авторадииграфии. След на рентгеновской пленке указывает на положение искомого фрагмента ДНК в геле. Этот фрагмент

выделяют, экстрагируя его из соответствующей зоны геля, которую предварительно механически вырезают.

Объединение фрагментов ДНК

При объединении фрагментов ДНК возникают две проблемы — структурная (проблема совместимости концов объединяемых фрагментов) и концентрационная (проблема соотношения концентраций объединяемых фрагментов).

Непосредственное объединение. Без предварительной подготовки лигируют рестрикты, имеющие совместимые концы — липкие или ровные. Липкие концы объединяются в результате элементарных взаимодействий с последующим действием ДНК-лигазы (см. рис. 7.1). Фрагменты ДНК с ровными концами объединяют с помощью ДНК-лигазы фага Т4. Ввиду низкой эффективности этой реакции концентрации ДНК и фермента при этом должны быть на порядок выше, чем при объединении липких концов. Если векторные молекулы и чужДНК обработаны одной рестриктазой или их изошизомерами, то клонируемый фрагмент можно “вырезать” из рекДНК с помощью тех же рестриктаз. Ход операций по лигированию контролируют электрофорезом в геле.

Лигирование молекул ДНК, обладающих совместимыми концами, неизбежно сопровождается их циркуляризацией вследствие объединения собственных концов, что снижает выход рекДНК. Удачный выбор концентраций ДНК уменьшает влияние этого фактора.

Рассмотрим сначала для простоты вариант, когда лигируются векторные молекулы, предварительно линеаризованные рестриктазой. Молекулу ДНК в растворе можно представить в виде случайного клубка, в котором один конец молекулы находится от другого на некотором среднем расстоянии, зависящем от ее длины. Среднее же расстояние от этого конца молекулы до ближайших концов других молекул определяется концентрацией ДНК. В процессе лигирования объединяются два статистически близких друг к другу конца вне зависимости от того, какой молекуле они принадлежат. Таким образом, идут параллельно две реакции — межмолекулярная, приводящая к образованию конкатемеров, и внутримолекулярная, ведущая к рециркуляризации вектора. Скорости обеих реакций и их результат зависят от соотношения указанных

выше расстояний. Для этих условий вполне очевидно, что: 1) при фиксированной длине вектора вероятность циркуляризации увеличивается с уменьшением его концентрации; 2) чем меньше размер молекул при постоянной концентрации концов ДНК, тем больше выход кольцевых структур.

Из теории внутримолекулярной конденсации, развитой для полимеров и применимой для рассматриваемого варианта, следует, что зависимость концентрации полимера j (г/л), при которой скорости меж- и внутримолекулярной реакций равны, от молекулярной массы M в дальтонах выражается формулой $j = 51,1 \times M^{-1/2}$. Согласно расчету, величина j для векторов λ и pBR322 составляет 10 и 32 мкг/мл, соответственно, а для кДНК размером 1 т.п.н. — 63 мкг/мл.

Согласно той же теории, если объединяемые молекулы имеют разные длины, то лучший выход достигается при их эквимольных концентрациях. При значительном отклонении от эквимольности будут образовываться олигомеры преобладающего компонента. Рассчитаем условия для клонирования кДНК (1 т.п.н.) в векторе pBR322 (4,36 т.п.н.). Поскольку определяющей является концентрация меньшего фрагмента, возьмем величину 63 мкг/мл, при которой половина молекул кДНК будет готова для межмолекулярных взаимодействий. Эквимольную концентрацию C вектора pBR322 подсчитываем из соотношения $(C/m)_{pBR} = (j/m)_{кДНК}$, где m — длина молекул в т.п.н. Она будет равна $63 \times 4,36/1 = 275$ мкг/мл. Отсюда ясна необходимость повышенных концентраций объединяемых молекул, когда вставка имеет небольшой размер. При клонировании фрагмента ДНК размером 5 т.п.н. в плазмиде pBR322 определяющей становится ее концентрация. Эквимольная концентрация C чужДНК подсчитывается из соотношения $(j/m)_{pBR} = (C/m)_{чужДНК}$. Она равна $32 \times 5/4,36 = 37$ мкг/мл.

Реакции лигирования проводят обычно в объеме 10 мкл, для чего требуется брать по несколько десятых микрограмма ДНК. Если данные о концентрации и качестве ДНК неопределенны, то рекомендуется экспериментально найти оптимальное соотношение концентраций лигируемых молекул. Это замечание тем более справедливо для клонирования с использованием λ векторов, поскольку в реакции лигирования присутствуют два его плеча. В этом

случае следует провести предварительные эксперименты с молярным отношением вектор : вставка от 0,25:1 до 8:1, исходя из того, что в пробирку добавлено 0,5—1,0 мкг векторной ДНК.

Фрагменты ДНК с липкими и ровными концами встраиваются в соответствующие сайты векторов в любой ориентации, что неприемлемо для многих экспериментов, в частности, в опытах по экспрессии клонируемых генов. Когда клонирование необходимо проводить ориентированно, вектор и фрагмент ДНК обрабатывают двумя рестриктазами так, чтобы у них образовались различные ступенчатые концы. Это обеспечивает определенное расположение фрагмента в рекДНК. Дополнительное преимущество этого способа клонирования — отсутствии циркуляризации молекул, что увеличивает выход рекДНК.

Иногда циркуляризацию можно предотвратить, объединяя фрагменты ДНК, полученные действием рестриктаз, образующих одинаковые липкие концы, но имеющих разные сайты узнавания. Например, при лигировании смеси рестриктов *Xma*I (C↓CCGGG) и *Ngo*MI (G↓CCGGC) в присутствии соответствующих рестриктаз ковалентно объединяются лишь разноименные рестрикты, поскольку только гибридные сайты CCCGGC и GCCGGG, образовавшиеся на их стыках, устойчивы к действию обеих рестриктаз. В результате фракция кольцевых молекул будет состоять исключительно из рекДНК. Клонлируемый фрагмент можно “вырезать” отсюда рестриктазой *Hpa*II (C↓CGG), если в нем самом нет последовательности CCGG. Следует учесть, что ДНК-лигазы работают только при низкой ионной силе, поэтому этот способ применим лишь для небольшого числа пар рестриктаз.

Ферментативная модификация концов. Модификацию концов лигируемых молекул ДНК проводят для разных целей. В частности, основное средство предотвращения циркуляризации молекул — предварительная обработка щелочной фосфатазой *E. coli* меньшего по размеру компонента (обычно это линейаризованный вектор), после чего концы таких молекул не замыкаются друг с другом лигазой из-за отсутствия у них фосфатных групп. В то же время клонируемый фрагмент встраивается в векторную молекулу благодаря наличию у него этих групп (рис. 8.1). Оставшиеся дефекты в рекДНК устраняются *in vivo* после трансформации клеток.

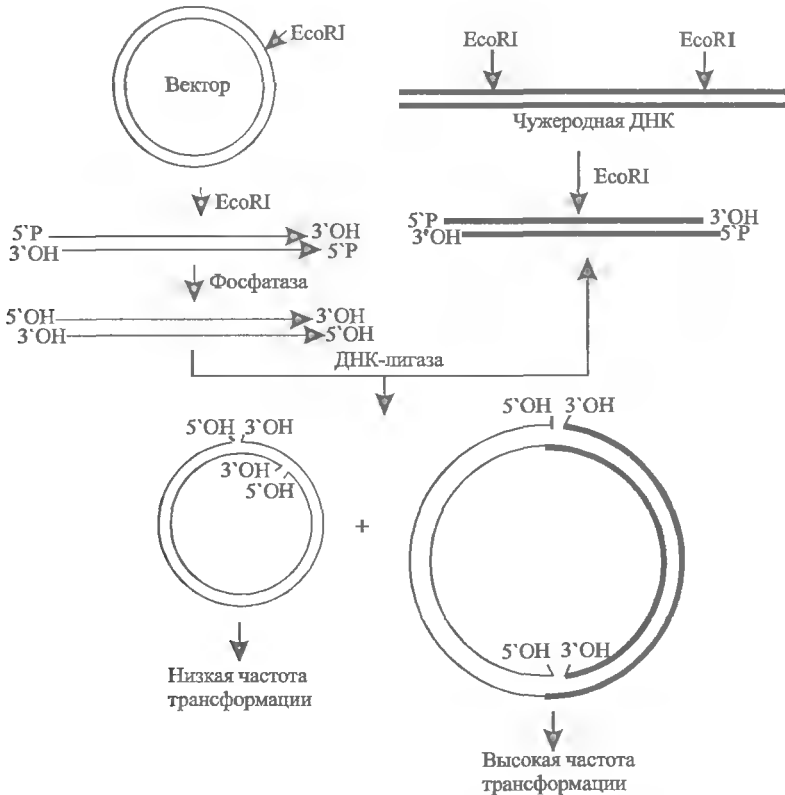


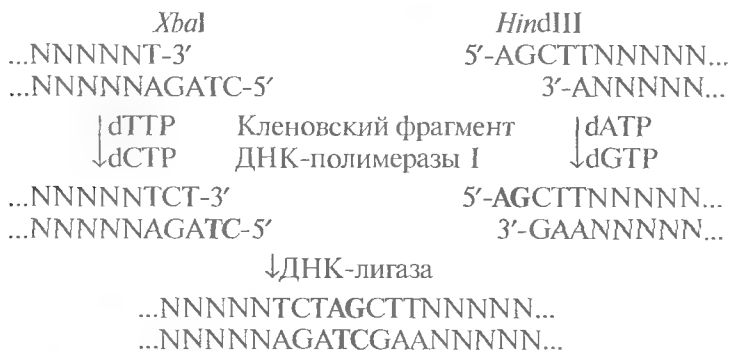
Рис. 8.1. Способ предотвращения рециркуляции векторной ДНК с помощью фосфатазы

Частая процедура в молекулярном клонировании — переключение фрагмента ДНК, т. е. его перенос из одного вектора в другой. При этом обычно возникает проблема несовместимости концов фрагмента и нового вектора, которая решается несколькими способами.

Ступенчатые концы фрагментов ДНК можно сделать ровными. Выступающий 3'-конец можно гидролизовать нуклеазой S1 или нуклеазой из проростков золотистой фасоли. Но лучший результат достигается использованием 3'→5' экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы фага Т4 в присутствии всех четырех

дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP). Если выступает однонитевой 5'-конец, то брешь заполняют с помощью кленовского фрагмента ДНК-полимеразы I, добавляя в среду необходимые dNTP. Например, если фрагмент ДНК получен действием рестриктазы *EcoRI*, то достаточно добавить только dATP и dTTP.

Получил распространение способ создания липких концов частичным заполнением концевой 3'-бреши с помощью кленовского фрагмента ДНК-полимеразы I, что достигается добавлением в среду только определенных dNTP (Hung, Wensink, 1984; Zabarovsky, Allikmet, 1986). Так, оказывается возможным объединить, к примеру, *XbaI*- и *HindIII*-фрагменты:



Этот способ можно использовать, даже если в результате на концах ДНК выступает по одному комплементарному нуклеотиду или по два—три нуклеотида, один из которых не имеет комплементарного “партнера”.

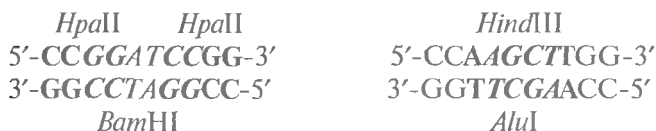
Выделение клонируемых фрагментов из рекДНК, полученных этими способами, естественно, затруднено. В случае необходимости переклонирования используют векторы, имеющие в себе полилинкеры, или применяют линкеры и адаптеры.

Использование линкеров. Синтетические олигонуклеотиды — линкеры и адаптеры применяют для объединения фрагментов ДНК, имеющих концы различного строения, и для введения специальных последовательностей в места соединения.

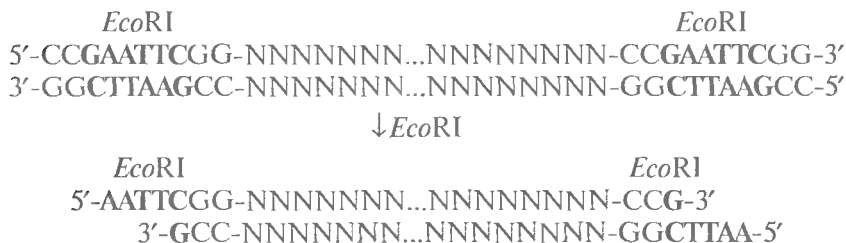
Линкерами называют однонитевые самокомплементарные олигонуклеотиды, которые образуют дуплексы, имеющие ровные концы и содержащие сайты рестрикции (выделены шрифтом):



Сайтов рестрикции в линкере может быть несколько:



Линкеры с определенным сайтом рестрикции используют для присоединения фрагментов ДНК, имеющих ровные концы, к ступенчатым концам вектора, образованным одноименной рестриктазой. Для этого линкеры в виде дуплексов вначале “пришивают” с двух сторон к фрагментам ДНК с помощью ДНК-лигазы фага Т4, а затем обрабатывают соответствующей рестриктазой:



Далее фрагменты и векторы объединяют через образовавшиеся липкие концы. Конечно, этот способ непригоден, если клонируемый фрагмент содержит сайт узнавания для той же рестриктазы.

Присоединение разных линкеров к фрагменту и образование у него различных ступенчатых концов предотвращает его циркуляризацию и позволяет проводить его ориентированное встраивание в вектор. Такая техника применима для клонирования кДНК. На стадии до обработки двунитевой кДНК нуклеазой S1 (см. рис. 6.1) к ней присоединяют линкер L1, а другой линкер L2 добавляют после действия этой нуклеазы (рис. 8.2). Далее кДНК и вектор с нужным полилинкером гидролизуют подходящими рестриктазами RL1 и RL2 и проводят лигирование образовавшихся фрагментов. Подобный метод был впервые апробирован при клонировании дуплекса кДНК гена глобулина $\alpha_2\mu$ (Kurtz, Nicodemus, 1981).

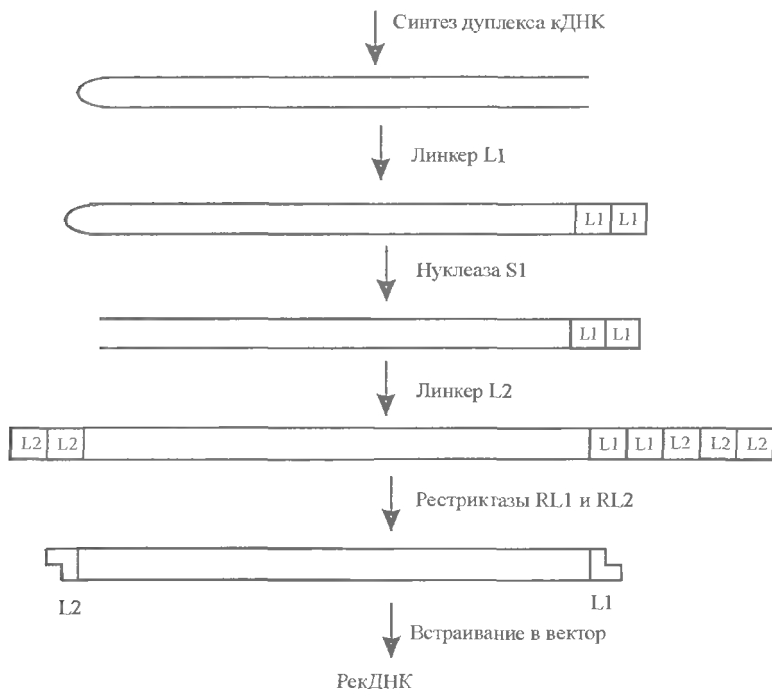


Рис. 8.2. Этапы клонирования кДНК методом двойных линкеров

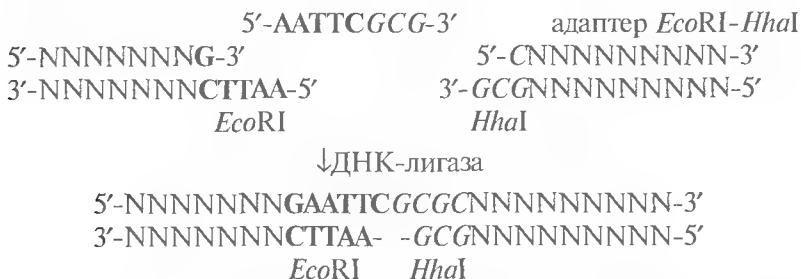
Линкеры используют также для объединения молекул ДНК, обладающих ровными концами неопределенного строения, с целью образования сайта рестрикции на стыке молекул. Для клонирования больших фрагментов ДНК удобны линкеры, содержащие сайты узнавания для редкощепящих рестриктаз, например, для *NotI* — 5'-AGCGGCCGCT-3'.

Разработаны и выпускаются (в частности, фирмой New England Biolab) линкеры для белковой инженерии. Наряду с сайтом рестрикции они содержат терминирующий или смысловой кодоны, вводимые таким образом в место стыка молекул ДНК. Терминирующие кодоны позволяют в процессе трансляции проводить в супрессирующих клетках запланированное слияние функциональных полипептидных фрагментов. Вставленные смысловые кодоны могут приводить к появлению в белках

структурных особенностей (β -поворот, гидрофобность и т.п.) или аминокислот, способствующих детерминированной фрагментации рекомбинантного белка (см. гл. 10). Примерами могут служить линкеры 5'-CTAGCTAGCTAG-3' (сайт для рестриктазы *NheI* и амбер-кодон), 5'-TCCCCCGGGGA-3' (*SmaI* и кодон для пролина), 5'-CATGCATGCATG-3' (*SphI* и кодон для метионина).

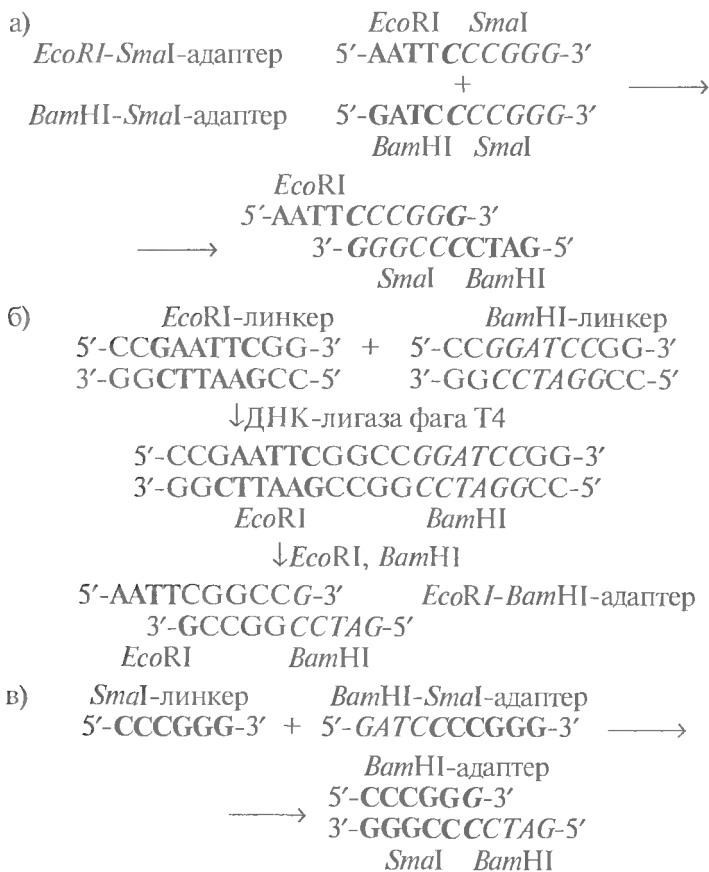
Использование адаптеров. Адаптерами называют одно- или двунитевые олигонуклеотиды, предназначенные для объединения молекул с несовместимыми концами. У дуплексов концы разные: один конец ровный, а другой ступенчатый, либо оба конца ступенчатые. Адаптеры применяют, когда концы векторных и клонируемых молекул образованы различными рестриктазами, а также когда в клонируемых фрагментах ДНК есть сайты используемых рестриктаз.

Однонитевые адаптеры применяют для объединения молекул ДНК с 5'- и 3'-выступающими концами. Например, концы, образованные рестриктазами *EcoRI* и *HhaI*, "состыковывают" с помощью *EcoRI-HhaI*-адаптера:



Возникающие при этом пробелы (бреши) в двунитевой структуре ДНК заполняются нуклеотидными остатками *in vivo* после трансформации.

В готовом виде имеются лишь однонитевые линкеры и адаптеры (табл. 8.1), причем фирмы предлагают также варианты с дефосфорилированными 5'-концами. Последние используют для предотвращения их самолигирования в опытах по клонированию. Двунитевые адаптеры при необходимости получают комбинацией двух однонитевых адаптеров (а), двух линкеров (б), адаптера и линкера (в):



Двунитевые адаптеры с различными выступающими концами способны изменять выступающие концы ДНК. Такие адаптеры называют конверсионными. Примером их может служить адаптер *EcoRI-BamHI*, с помощью которого *BamHI*-концы можно заменить *EcoRI*-концами и интегрировать модифицированные таким образом фрагменты ДНК в *EcoRI*-сайты векторов.

Иногда сайты узнавания для рестриктаз, используемых при внедрении фрагмента в вектор, располагаются внутри этого фрагмента. В таких случаях данный фрагмент “вырезают” с помощью других рестриктаз, для чего на его концах создают соответствующие

щие сайты узнавания. Для этих целей используют адаптеры, содержащие такие сайты. Например, если вышеприведенный *Bam*HI-адаптер использовался для встраивания фрагмента ДНК, обладающего ровными концами и имеющего в себе *Bam*HI-сайт, в такой же сайт вектора, то его можно “вырезать” из рекДНК с помощью рестриктазы *Sma*I:

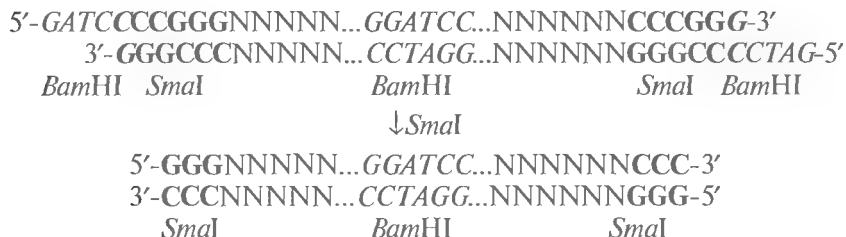


Таблица 8.1

**Предлагаемые препараты линкеров (Promega)
и адаптеров (New England Biolab)**

Линкеры		Адаптеры	
<i>Bam</i> HI	5'-d(CGGATCCG)-3'	<i>Bam</i> HI- <i>Sma</i> I	5'-d(GATCCCCGGG)-3'
<i>Eco</i> RI	5'-d(CGCGAATTCG)-3'	<i>Bam</i> HI- <i>Xmn</i> I	5'-d(GATCCGAAGGGGTTCG)-3'
<i>Hind</i> III	5'-d(CAAGCTTG)-3'	<i>Eco</i> RI- <i>Not</i> I	5'-d(AATTCGCGGCCGCT)-3'
<i>Kpn</i> I	5'-d(GGGTACCC)-3'	<i>Eco</i> RI- <i>Sma</i> I	5'-d(AATTCCTCCGGG)-3'
<i>Mlu</i> I	5'-d(CGACGCGTCG)-3'	<i>Eco</i> RI- <i>Xmn</i> I	5'-d(AATTCGAACCCCTTCG)-3'
<i>Not</i> I	5'-d(TTGGCGCCGCAA)-3'	<i>Hind</i> III- <i>Sma</i> I	5'-d(AGCTCCCGGG)-3'
<i>Pst</i> I	5'-d(GCTGCAGC)-3'	<i>Hind</i> III- <i>Xmn</i> I	5'-d(AGCTCGAAGGGGTTCG)-3'
<i>Sal</i> I	5'-d(GGTCTGAC)-3'	<i>Not</i> I- <i>Xmn</i> I	5'-d(GGCCCGAACCCCTTCG)-3'
<i>Sma</i> I	5'-d(CCCCGGGG)-3'	<i>Sal</i> I- <i>Sma</i> I	5'-d(TCGACCCGGG)-3'
<i>Xba</i> I	5'-d(GCTCTAGAGC)-3'	<i>Xba</i> I- <i>Xmn</i> I	5'-d(CTAGCGAAGGGGTTCG)-3'

Коннекторный метод. Этот метод позволяет объединять любые двунитевые фрагменты ДНК путем ферментативного наращивания на их концах одонитевых комплементарных участков (рис. 8.3). Именно с его помощью была сконструирована первая рекДНК (Jackson *et al.*, 1972), положившая начало генетической инженерии. Суть данного процесса сводится к следующему. Фрагменты ДНК и линейризованный вектор с концами любого строения обрабатывают экзонуклеазой фага λ для “обнажения” 3'-концов. Это облегчает течение последующей реакции, когда терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза наращивает на

3'-концах фрагментов одонитевые гомополимерные участки из 10–30 звеньев, используя добавленный в среду определенный дезоксирибонуклеозидтрифосфат. Если синтезированные участки у разных фрагментов состоят из комплементарных нуклеотидов, то фрагменты могут объединяться с их помощью. В местах соединения фрагментов из-за неодинаковой длины гомополимерных “хвостов” получаются одонитевые бреши или избыточные одонитевые концы. Ранее эти дефекты исправлялись *in vitro* репарационными ферментами — ДНК-полимеразой I, экзонуклеазой III и ДНК-лигазой, после чего образовавшимися рекДНК трансформировали реципиентные клетки.

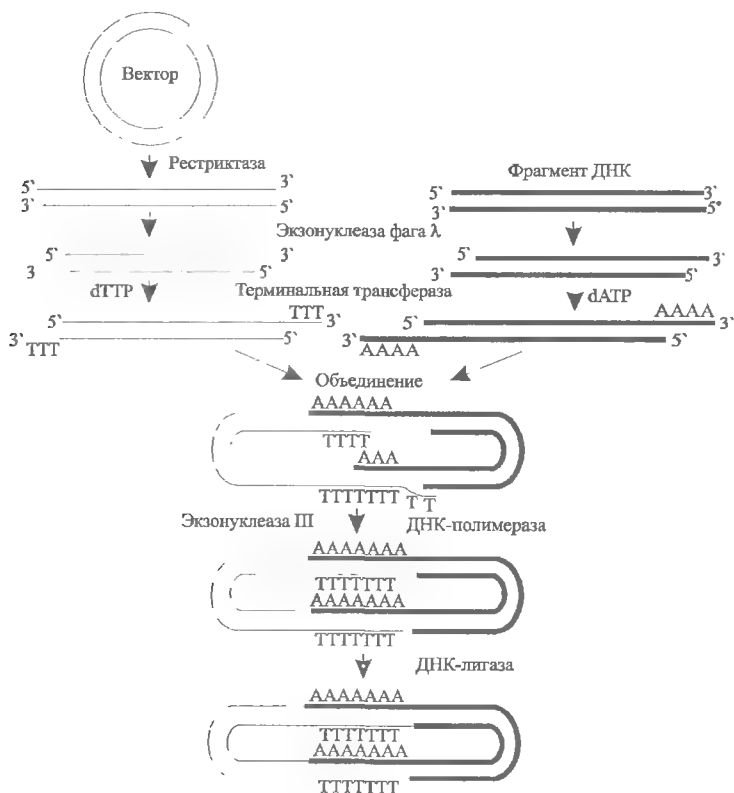


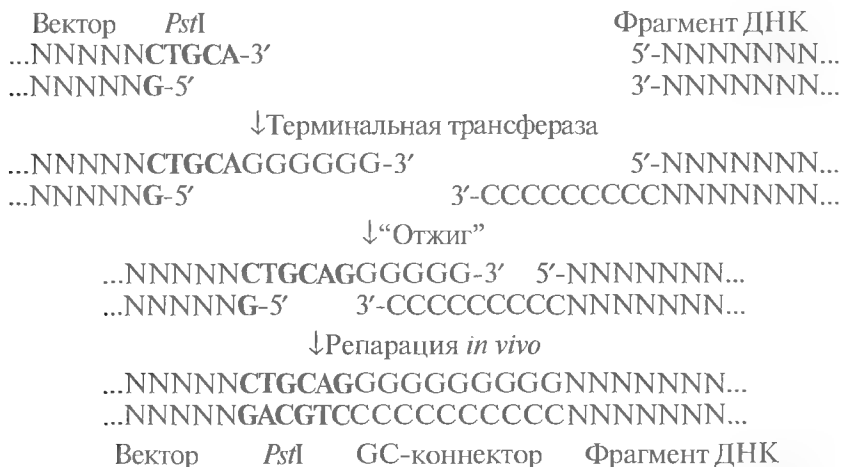
Рис. 8.3. Схема объединения молекул ДНК коннекторным методом

В настоящее время этот метод значительно упрощен. Во-первых, найдены условия, при которых концевая трансфераза ведет реакцию без предварительной обработки фрагментов ДНК экзонуклеазой. Во-вторых, операции по удалению избыточных концов или по заполнению брешей после объединения фрагментов осуществляются *in vivo* в самой трансформированной клетке. Однако при использовании такого модифицированного метода снижается выход трансформантов.

Отметим, что при применении коннекторного метода исключаются сцепление концов одной и той же молекулы и объединение одноименных ДНК. Это обеспечивает повышенную эффективность образования рекДНК.

Для выделения клонируемых фрагментов из рекДНК предложены различные способы, основанные на особенностях строения GC- и AT-коннекторов.

Можно применять векторы, имеющие *Pst*I-сайт (CTGCA↓G). Добавление к ним олиго(dG), а к клонируемому фрагменту — олиго(dC) позволяет после образования рекДНК восстановить *Pst*I-сайт и вырезать клонируемый фрагмент с помощью одноименной рестриктазы:



Если фрагменты объединены с помощью AT-коннектора, разъединить их можно нуклеазой S1 в условиях частичной денатурации ДНК (45–50 % формамида).

Однако образующиеся при использовании коннекторного метода гомополимерные участки снижают эффективность экспрессии клонируемых генов, если транскрипция осуществляется с векторного промотора. Кроме того, они обуславливают внутримолекулярные рекомбинации *in vivo* по гомологичным участкам и тем самым увеличивают нестабильность рекДНК.

Синтез олигонуклеотидов и генов

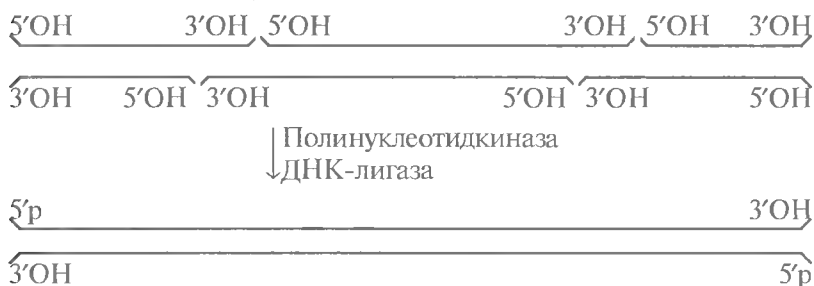
Олигонуклеотиды (линкеры, адаптеры, праймеры, промоторы и т. п.) синтезируют химическим методом, а гены и их фрагменты — химико-ферментативным.

При синтезе односторонних олигонуклеотидов наращивают их цепочки, присоединяя определенные звенья в заданной последовательности. Побочные реакции предотвращают химической защитой реакционноспособных групп, которые не участвуют в реакции полимеризации. Таким ступенчатым способом синтезируют лишь 3–4-членные олигонуклеотиды. При большем количестве членов разделение продуктов реакции затрудняется, и тогда применяют блочный метод синтеза, при котором объединяют предварительно синтезированные ди- или тринуклеотиды. Так синтезируют 10–15-членные олигонуклеотиды. Из них после удаления защитных групп можно собирать фрагменты генов или даже целые гены.

Аналогично происходит синтез олигонуклеотидов в твердой фазе, только в данном случае их первые члены соединяют с нерастворимой матрицей (специально модифицированный полимер). При этом растущий олигонуклеотид также оказывается в твердой фазе, что значительно облегчает его очистку от побочных продуктов реакции и смену реагентов. По завершении синтеза готовый олигонуклеотид отделяют от матрицы. Такой метод позволяет стандартизировать этапы синтеза олигонуклеотидов. На его основе сконструированы так называемые синтезаторы ДНК, осуществляющие полный автоматический синтез олигонуклеотидов длиной в несколько десятков членов со скоростью 4–5 нуклеотида в час.

Основные принципы химико-ферментативного синтеза двусторонних фрагментов ДНК разработаны Кораной в конце 60-х годов. Они предусматривают несколько этапов данного процесса.

На первом этапе химически синтезируют 10–20-членные одонитевые олигонуклеотиды, из которых затем образуют двунитевые фрагменты ДНК. При этом соседние олигонуклеотиды, относящиеся к комплементарным нитям, должны частично перекрываться друг с другом 5–6 нуклеотидными остатками. Далее 5'ОН-концы олигонуклеотидов фосфорилируют с помощью полинуклеотидкиназы и поочередно объединяют молекулы с перекрывающимися комплементарными последовательностями, а смежные олигонуклеотиды “сшивают” ДНК-лигазой:



Таким способом был синтезирован первый полный ген — ген тирозиновой тРНК дрожжей (Khorana *et al.*, 1976), представляющий собой двунитевой фрагмент ДНК, состоящий из 199 п.н. К 5'-концам нитей были добавлены одонитевые участки ААТТ, с помощью которых ген встроили через *EcoRI*-сайт в вектор (рис. 8.4). Для синтеза промоторного и терминирующего участков гена и части гена, кодирующей процессируемый участок транскрипта, были использованы информация о нуклеотидной последовательности молекулы тРНК и ее предшественника, а также данные о строении бактериальных промоторов и терминаторов транскрипции. Из синтезированных 38 одонитевых олигонуклеотидов сначала было собрано семь двунитевых блоков с одонитевыми концами. Эти блоки содержали от трех до семи олигонуклеотидов с комплементарными участками. Далее они были последовательно объединены в единый ген. Он имел мутацию, позволявшую тРНК супрессировать амбер-мутации. Именно такой эффект и был обнаружен при введении синтетического гена в клетки *E. coli*, что свидетельствовало о его функциональной активности.

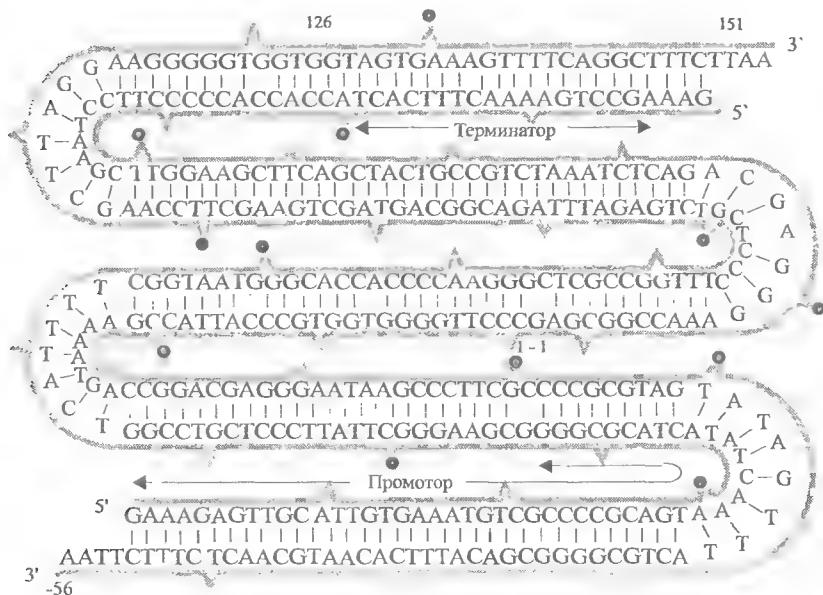
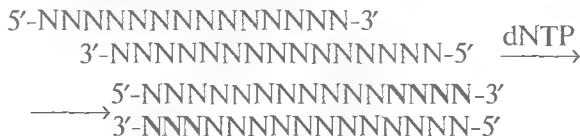


Рис. 8.4. Строение гена тирозиновой тРНК дрожжей, синтезированного в лаборатории Кораны.

^ — концы химически синтезированных фрагментов; • — концы блоков. Цифрами обозначены номера нуклеотидов, начиная от старта транскрипции гена

Сложность и трудоемкость описанного процесса очевидны. Он был заметно упрощен использованием ДНК-полимеразы для достройки частичных дуплексов с выступающими 5'-концами до полностью двуцепочечных фрагментов:



Такие дуплексы затем последовательно объединяют с помощью ДНК-лигазы фага Т4 и внедряют в вектор.

На практике по мере увеличения числа лигазных “сшивок” становится все труднее очищать продукты реакции и получать их

в достаточном количестве для дальнейшей работы, увеличивается и расход исходных синтетических олигонуклеотидов. Поэтому в дальнейшем при создании синтетических генов стадии накопления и очистки промежуточных фрагментов стали осуществлять также методом клонирования, снабжая фрагменты для этого концевыми вспомогательными сайтами рестрикции. Сам же ген “собирают” в векторе, имеющем подходящий полилинкер (рис. 8.5). Вспомогательные сайты рестрикции, оказавшиеся внутри гена, убирают последовательным действием соответствующей рестриктазы, нуклеазы S1 и ДНК-лигазы.

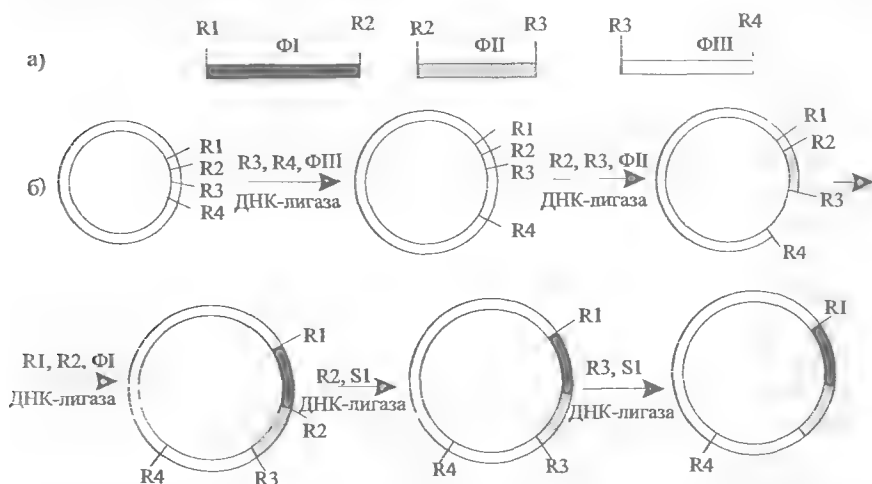


Рис. 8.5. Схема сборки синтетического гена из фрагментов ΦI , ΦII и ΦIII : а — фрагменты (Φ) гена, концы которых приспособлены для взаимодействия с липкими концами различных рестриктаз R; б — последовательные стадии внедрения фрагментов в кольцевой вектор и удаления вспомогательных сайтов рестрикции R2 и R3

Направленный мутагенез

Спектр мутаций широк, и все их виды (точечные, делеции, инсерции, инверсии) можно осуществлять направленно методами *in vitro*, получая заданное изменение в определенном гене и даже нуклеотиде. Важность этого подхода трудно переоценить. Кроме получения измененных белков существенно облегчилось само

конструирование рекДНК. Появилась возможность вводить или убирать в нужных местах сайты рестрикции, добавлять регуляторные сигналы в начало или в конец генов, элиминировать интроны и т. п.

Рассмотрим сначала получение точечных мутаций. Различают два их типа — сайт-специфический и сегмент-специфический. Первый сводится к введению определенной мутации в заданный сайт ДНК. При осуществлении мутагенеза второго типа мутации вводят в участок ДНК ограниченной длины, а распределяются они случайным образом.

Сайт-специфический мутагенез. Его можно проводить только в случае, если известно строение соответствующего участка ДНК. Для этого синтезируют олигонуклеотид с заданным изменением и затем интегрируют его в геном. Этот метод был разработан при постановке опытов по мутагенезу ДНК фага $\phi X174$ (Hutchison *et al.*, 1978). Авторы синтезировали 7—10-членные олигонуклеотиды, комплементарные выбранным участкам $\phi X174$. При этом были запрограммированы определенные точечные мутации — транзиции, трансверзии, делеции и вставки оснований. Олигонуклеотиды гибридизовали с однострочной фаговой ДНК при 10 °C и использовали в качестве праймеров для синтеза *in vitro* второй цепочки ДНК (рис. 8.6). Синтез вели с помощью кленовского фрагмента ДНК-полимеразы I, чтобы исключить выщепление праймера при завершении синтеза. Затем с помощью ДНК-лигазы получали ковалентно замкнутые репликативные формы (РФ) фаговой ДНК, нуклеазой S1 убрали незавершенные продукты синтеза и трансфицировали сферопласты *E. coli* C. В образовавшемся потомстве фагов от 1 до 40 % частиц (в зависимости от типа мутации) были мутантами. Выход мутантов можно увеличить до 100 %, если суммарную ДНК, выделенную из фагов, повторно использовать для синтеза *in vitro* РФ с помощью тех же синтетических праймеров. Объясняется это тем, что при температуре 25 °C праймеры гибридизуются практически только с мутантной однострочной ДНК. Поэтому при повторении процедуры мутагенеза в потомстве фагов будут присутствовать лишь мутантные формы.

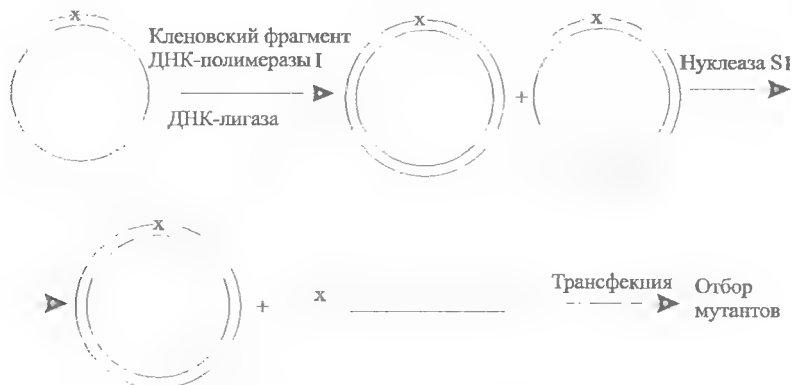


Рис. 8.6. Направленный сайт-специфический мутагенез с помощью синтетического олигонуклеотида.

X — место мутации

Описанный метод по-прежнему широко используется, в него внесены лишь некоторые изменения. Во-первых, мутируемый фрагмент ДНК клонируется в векторах типа M13mp, позволяющих выделение из них этого фрагмента в однострочной форме. Во-вторых, выяснены условия для синтеза мутагенного олигонуклеотида. Для осуществления точечной замены синтезируют олигонуклеотид длиной 17–19 звеньев с заменяемым нуклеотидом посередине. Если заменяют, добавляют или удаляют два или большее число звеньев, то в олигонуклеотиде по обе стороны от замены должно быть по 12–15 комплементарных нуклеотидов. Конечно, чем больше замена, тем меньше выход мутантов. Например, вероятность получить делецию в несколько сотен пар нуклеотидов в 50 раз меньше вероятности получения точечной мутации. В-третьих, для предотвращения репарации неспаренных оснований, образовавшихся после раунда репликации *in vitro*, и возврата их к дикому типу для трансфекции берут клетки *E. coli* с мутациями в генах *mutL*, *mutS* или *mutH*, которые осуществляют этот тип репарации. В-четвертых, поиск мутантной ДНК ведут методом гибридизации с исходным олигонуклеотидом в условиях (например, пониженная температура), исключающих его связывание с ДНК дикого типа. Мутированная ДНК не отличается,

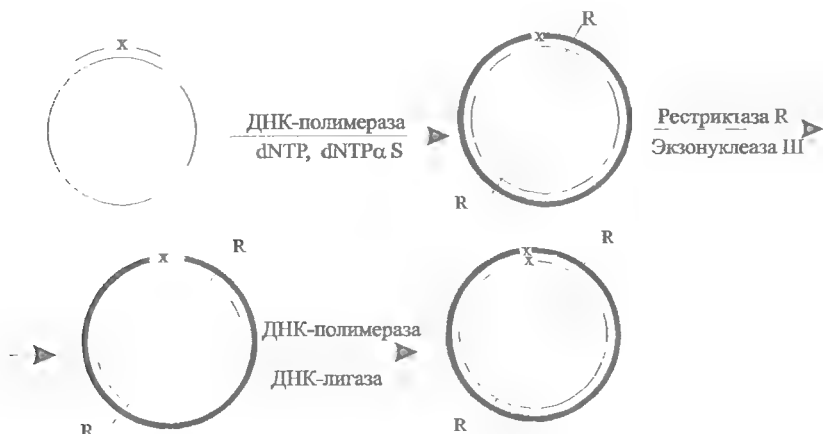


Рис. 8.8. Направленный сайт-специфический мутагенез с помощью синтетического олигонуклеотида и использования одного из тионуклеотидов (dNTP α S).

x — место мутации; жирным выделена нить, содержащая тионуклеотиды

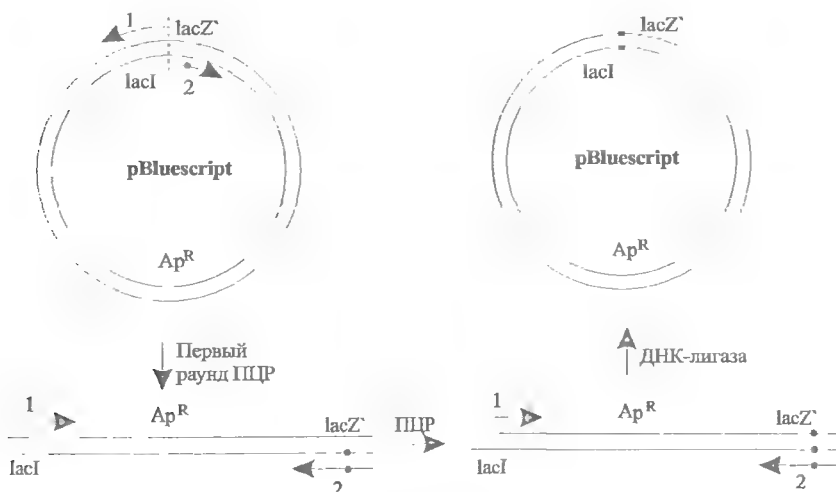


Рис. 8.9. Введение мутации в ген *lacZ* с помощью полимеразной цепной реакции.

Мутация зашифрована в праймере 2. Праймеры обозначены стрелками, мутация — жирной точкой

Если известно, какую аминокислоту надо заменить, но не ясно — на какую, применяют метод случайного мутагенеза данного кодона (Reidhaar-Olson, Sauer, 1988). Для этого синтезируют олигонуклеотид, включающий мутируемый кодон. Когда в процессе синтеза очередь доходит до первых двух нуклеотидов кодона, то в реакционную среду добавляют все четыре dNTP, а при подстановке третьего нуклеотида в среде присутствует смесь dGTP и dCTP. Эта процедура проводится для того, чтобы полученный препарат олигонуклеотида содержал в мутируемом сайте варианты кодонов для всех 20 аминокислот. Синтезируют также комплементарную нить, в которой данный кодон представлен только остатками инозина (I), потому что он способен образовывать водородные связи с любым из четырех стандартных нуклеотидов. Образовавшимся дуплексом



с помощью предусмотренных для этого сайтов рестрикции R1 и R2 замещают аналогичный участок гена.

Отметим также возможность направленно изменять последовательность нуклеотидов в сайте рестрикции с помощью линкеров или адаптеров. Так можно вставить в ген дополнительные кодоны, сделать новый сайт рестрикции и т. д.

Сегмент-специфический мутагенез. Этот метод мутагенеза применяется в тех случаях, когда ясно, какой сегмент гена следует изменить, но не известно, какой нуклеотид конкретно. Простейший способ такого мутагенеза заключается в выделении искомого сегмента в виде рестрикта, в обработке его каким-либо химическим мутагеном и в последующем встраивании в естественное для него место в гене. Затем среди клеток, содержащих рекДНК, отыскивают те, которые приобрели необходимый фенотип. Этот способ ограничен узким кругом образующихся мутаций, он крайне неэффективен и поэтому редко применяется.

Более продуктивен мутагенез, осуществляемый на одонитевых ДНК. Искомый сегмент переносят в вектор M13mp и одонитевую ДНК рекомбинантного фага обрабатывают химическими мутагенами. Обычно применяют бисульфит натрия, который, дезаминируя дезоксицитидиновые остатки, превращает их в уриди-

новые. Используют также вещества, модифицирующие основания (гидразин модифицирует пиримидины, муравьиная кислота — пурины, азотистая кислота — аденин и цитозин). Далее с использованием стандартного праймера (им может служить также нить какого-либо рестрикта клонируемого фрагмента) и ДНК-полимеразы частично восстанавливается вторая нить (рис. 8.10). При применении бисульфита натрия в синтезируемую нить ДНК вместо дезоксигуанозина подставляется дезоксиаденозин, что в дальнейшем приведет к транзиции — замене GC-пар на AT-пары. При использовании модификаторов в результате мутирования будут образовываться транзиции и трансверзии, поскольку ДНК-полимераза, встречаясь с модифицированным основанием, подставляет случайный нуклеотид. На заключительном этапе сегмент переклонируют в неповрежденный вектор и результат выявляют проверкой фенотипа трансформированных клеток.

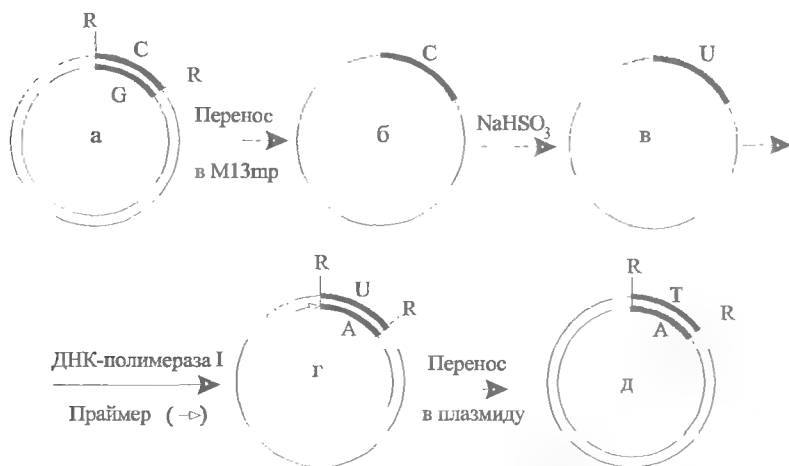


Рис. 8.10. Мутирование сегмента ДНК с помощью бисульфита натрия: а — рекомбинантная плазмида; б — нить ДНК рекомбинантного фага M13mp; в — та же нить после мутагенеза; г — синтез второй нити рекомбинантной фаговой ДНК; д — рекомбинантная плазмида с мутантной вставкой.

Мутлируемый сегмент выделен жирной линией; R — сайт рестрикции; стрелкой указано положение праймера

Этапа переклонирования можно избежать, если в рекДНК удастся создать односторонний участок в районе искомого сегмента. Один из способов заключается во введении ника рядом с этим сегментом и в образовании бреши в его сторону с помощью экзонуклеазы III. Мутируемый сегмент ДНК обычно находится в векторной молекуле, поэтому для введения ника можно использовать подходящие сайты рестрикции, имеющиеся в полилинкере. Обработку ДНК рестриктазами ведут в присутствии бромистого этидия, поскольку при этом рестриктазы вместо расщепления ДНК образуют в ней ники. При необходимости ник можно переместить с помощью ДНК-полимеразы I (ник-трансляция) в нужное место.

Другой способ предусматривает делетирование в рекомбинантной плазмиде сегмента, который предстоит мутировать. Далее исходную и делетированную плазмиды линейаризуют через разные единственные сайты рестрикции, денатурируют и проводят совместную ренатурацию. В результате наряду с исходными плазмидами образуются гетеродуплексные молекулы с односторонней петлей в области мутируемого сегмента. После обработки смеси бисульфитом натрия и последующей трансформации клеток приступают к поиску мутантов.

Образование делеций. Ранее уже отмечалось, что делеции и вставки размером в несколько десятков нуклеотидных пар можно получить методами с использованием олигонуклеотидов. Делеции и вставки размером в несколько нуклеотидных пар можно получить, удаляя выступающие концы рестрикторов нуклеазой S1 или заполняя их ДНК-полимеразой. В результате после воссоединения рестрикторов ДНК-лигазой фага T4 в молекулах ДНК появляются микроделеции или микровставки. При желании увеличить размеры делеций концы рестрикторов дополнительно обрабатывают подходящими экзонуклеазами. К большим делециям приводит удаление из фрагмента ДНК участка, находящегося между двумя сайтами рестрикции, последовательным действием рестриктазы и лигазы.

В ряде случаев для секвенирования или анализа больших участков эукариотических генов необходимо иметь набор делеций, которые начинаются в общей точке и простираются в анализируемую область на разную длину. Это позволяет не проводить физическое картирование и секвенировать ее с использованием общего

праймера. Предложены различные методы образования таких делеций. Из методов *in vitro* наиболее удобен способ с использованием экзонуклеазы III (Henikoff, 1984). Он основан на устойчивости выступающих 3'-концов к действию этого фермента (см. гл. 6). Для его использования необходимо, чтобы в векторе рядом с анализируемой областью находились единичные сайты рестрикции А (ровные или 5'-выступающие концы) и В (3'-выступающие концы). После действия соответствующих рестриктаз линейаризованная ДНК подвергается обработке экзонуклеазой III в течение разных интервалов времени (рис. 8.11). Затем нуклеаза S1 и ДНК-полимераза формируют ровные концы у образовавшихся делеционных вариантов, которые, наконец, закольцовываются с помощью ДНК-лигазы фага Т4, образуя искомый набор рекДНК.

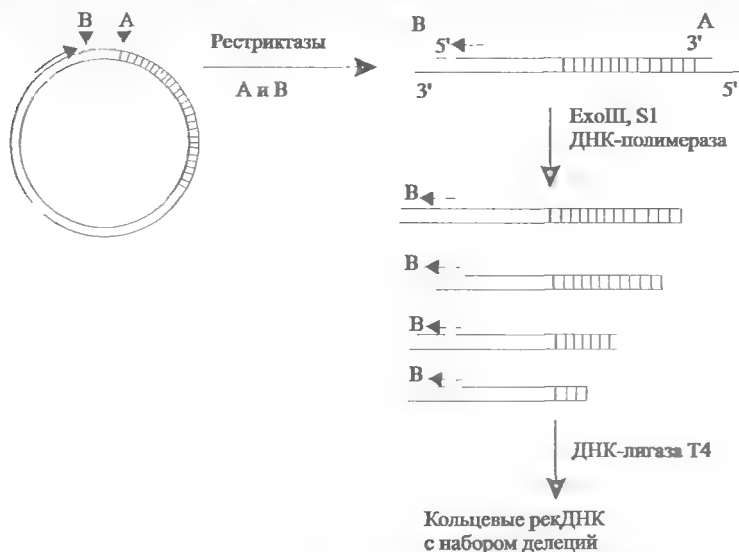


Рис. 8.11. Схема образования набора делеций с помощью экзонуклеазы III.

А и В — сайты рестрикции. Анализируемая область заштрихована; стрелкой указано положение праймера

Для образования делеций в клонируемой ДНК методом *in vivo* сконструированы векторы, которые содержат в своем составе

элементы транспозонов, обладающих случайными сайтами транс-позиции. Так, в векторе pDELTA-I (фирма Gibco BRL), созданном на базе плазмиды pUC19, встроены концевые инвертированные повторы δ транспозона Tn1000 (рис. 8.12, а). Вектор содержит маркеры для селекции (Tc^R и Km^R) и контрселекции ($strA$ — чувствительность к отсутствию стрептомицина, $sacB$ — чувствительность к присутствию сахарозы), а также локус $lacZ'$ с полилинкером. Клоны с рекомбинантными плазмидами выявляют по α -комплементации. Далее эти плазмиды переносят в клетки, содержащие плазмиду pXRD4043 с геном транспозазы Tn1000*tnpA*, которая активирует δ -повторы и вызывает образование делеций. Комбинирование маркеров позволяет отбирать делеции, простирающиеся в клонируемый фрагмент от определенного δ -повтора. На средах с тетрациклином и сахарозой происходит отбор делеций в направлении по часовой стрелке, а в присутствии стрептомицина и канамицина — в противоположном направлении. Рядом с δ -повторами находятся промоторы фагов T7 и SP6, которые позволяют с помощью универсальных праймеров секвенировать клонируемую ДНК с двух концов, используя набор отобранных делеционных вариантов. Присутствующий в векторе *cos*-сайт фага λ может быть использован для линеаризации рекДНК или для ее упаковки в фаговые головки.

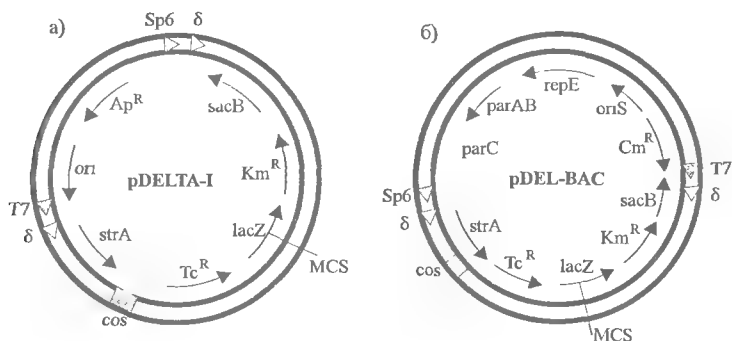


Рис. 8.12. Строение векторов pDELTA-I (а) и pDEL-BAC (б), предназначенных для образования делеций в клонируемой ДНК

Вектор pDELTA-I эффективен при внесении делеций во фрагменты ДНК размером до 40–50 т.п.н., поскольку из-за его мульт-

тикопийности более крупные вставки нестабильны. Этого недостатка лишен вектор pDEL-BAC (рис. 8.12,б), сконструированный заменой ColEI-подобного репликатора в плазмиде pDELTA-I на F-репликатор плазмиды pBAC108L (см. рис. 7.13). Вектор pDEL-BAC позволяет стабильно клонировать фрагменты ДНК длиной до 200 т.п.н. и вносить в них делеции (Чистяков, Чумаков, 1996). Для работы с ним используют штамм *E. coli* DH10B (см. табл. 7.1) и плазмиду pXRD4043.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОВТОРЕНИЯ И ОБСУЖДЕНИЯ

8.1. Рестриктазы *Bam*HI и *Bgl*II не являются изошизомерами, но образуют одинаковые липкие концы. Возможно ли ковалентное объединение разноименных рестриктов в присутствии ДНК-лигазы?

8.2. Между какими нуклеотидами в эксперименте, представленном на рис. 8.6 следует запланировать разрывы для образования фрагментов FI, FII и FIII, если R2 = *Eco*RI, а R3 = *Hind*III? Почему обработка нуклеазой S1 рекомбинантной ДНК, линейаризованной через сайты R2 и R3, не нарушает целостности гена после лигирования?

8.3. Каким образом осуществляют ориентированное встраивание фрагмента ДНК в вектор?

8.4. Какие операции позволяют проводить линкеры, предназначенные для белковой инженерии?

8.5. Почему многие адаптеры готовят в вариантах с дефосфорилированными 5'-концами?

8.6. Для создания *Eco*RI-сайта в гене *lacZ'* в 5-м кодоне гуанин был заменен аденином:



Как бы это сделали вы?

8.7. Составьте план эксперимента по получению набора делеций анализируемого фрагмента ДНК с помощью вектора pDELTA-I.

8.8. Вам поставлена задача получить набор фаговых мутантов, у которых поврежден только один определенный ген. Составьте план эксперимента по выполнению этого задания.

8.9. Как решается проблема циркуляризации фрагментов ДНК в процессе их лигирования?

8.10. Каким образом можно вводить ники в заданные участки ДНК?

Глава 9

АНАЛИЗ ГЕНОВ И ГЕНОМОВ

Информационным центром всего живого, определяющим индивидуальность каждого организма и вида, к которому он принадлежит, является геном. По определению он представляет собой совокупность всех генов организма с их регуляторными сайтами и включает также “молчащие” участки ДНК с неизвестными пока функциями. В простейшем случае ген содержит информацию о структуре одного полипептида. В более сложных случаях он может кодировать несколько полипептидов, считываемых в одной или разных рамках, с частичным или полным перекрытием генетической информации об этих полипептидах. В некоторых ситуациях можно говорить о гене, находящемся внутри другого гена. Белок-кодирующие части гена могут быть разъединены интронами или даже находиться на разных хромосомах. Определенная функция организма зависит от одного или нескольких генов. Отсюда понятен интерес к анализу структуры и функций генов и геномов.

Практически неизбежный первый шаг в проведении этого анализа — создание геномной библиотеки (банка генов). Она представляет собой совокупность всех нуклеотидных последовательностей хромосомной ДНК организма в виде фрагментов ДНК, клонированных в векторах. Если фрагменты физически картированы, т. е. если установлено их расположение на хромосомах, то такую библиотеку называют геномной энциклопедией. Банки служат источником материала для изучения строения и регуляции индивидуальных генов, а также для исследования структуры и функции белков. С их помощью также можно решать проблему сохранения генофонда исчезающих видов.

Для создания банка генов осуществляют тотальное клонирование, используя для встраивания в вектор смесь фрагментов ДНК,

полученную дроблением всей клеточной ДНК. Далее тем или иным способом отыскивают в банке клон с нужным геном. Индивидуальные гены составляют лишь незначительную часть банка, и отыскивать их довольно трудно. Для этого применяют метод гибридизации колоний и гораздо реже — иммунологические методы.

Серьезный прогресс в анализе геномов достигнут благодаря разработке новых методов и подходов. Это и введение физических геномных маркеров (ПДРФ, см. с. 294), появление быстрых способов картирования клонированных генов, возможность выяснения физической структуры геномов методом FIGE (гель-электрофорез с инверсией электрического поля, см. приложение). Например, генетически линейная хромосомная карта *Caulobacter crescentus* физически оказалась кольцевой. Ряд методов детально описан в пособии “Анализ генома. Методы”, 1990.

Точнейшей из операций по анализу строения генов и способов их регулирования является секвенирование. Секвенирование клонированных генов зачастую проводят также в тех случаях, когда оптимизируют их экспрессию. Секвенирование геномов помогает не только изучать их структуру, но и понять пути их эволюции. В практическом плане секвенирование важно для приготовления зондов с целью диагностики генетических заболеваний, идентификации микроорганизмов и т. д.

Проблемы создания геномной библиотеки

Число клонов в банке. Основная проблема, возникающая при создании банка генов — необходимость обеспечения его полноты. Она определяется вероятностью встречаемости (p) искомого гена в коллекции, состоящей из n клонов:

$$p = 1 - (1 - m/M)^n,$$

где M — молекулярная масса генома; m — средняя молекулярная масса клонируемых фрагментов ДНК. К банкам генов условно относят такую коллекцию клонов, в которой индивидуальные гены представлены с вероятностью не менее 0,95. Обычно на практике задают конкретную вероятность (0,90; 0,95 или 0,99) и, зная M и m , определяют n (Clarke, Carbon, 1976):

$$n = \ln(1 - p) / \ln(1 - m/M).$$

Так устанавливается число клонов, содержащих рекДНК, которое необходимо отобрать для обеспечения заданной вероятности. При $m/M \ll 1$, что характерно практически для всех геномов (кроме вирусных),

$$n = -M/m \times \ln(1-p).$$

Ориентировочные данные по числу клонов в банке для некоторых организмов представлены в табл. 9.1.

Таблица 9.1

Количество клонов в геномных библиотеках различных организмов, обеспечивающее 99%-ную вероятность встречаемости определенного гена

Источник ДНК	Средний размер гаплоидного генома, т.п.н.	Количество клонов для векторов			
		λ	космида	P1	YAC, BAC
		20*	45*	95*	300*
Кишечная палочка	$4,7 \cdot 10^6$	1100	480	220	73
Дрожжи	$1,4 \cdot 10^7$	3200	1400	680	210
Дрозофила	$1,8 \cdot 10^8$	41000	18000	8700	2800
Человек	$3,0 \cdot 10^9$	690000	310000	150000	46000
Пшеница	$1,7 \cdot 10^{10}$	3900000	1700000	820000	260000

*Средний размер вставок — в т.п.н.

Векторы для клонирования. Очевидно, что уменьшение значения m приводит к пропорциональному увеличению значения n . Поэтому для создания банка генов, казалось, следует клонировать как можно более крупные фрагменты ДНК. Однако чем длиннее фрагменты, тем труднее с ними манипулировать и сложнее их анализировать. Достаточно рутинны процедуры с молекулами ДНК размером до 50 т.п.н. Работа с молекулами ДНК длиной свыше 100 т.п.н. требует специальных методов и прибо-

ров. Поэтому выбор вектора определяется необходимым размером вставки, который в свою очередь зависит от цели создания банка.

Наиболее распространенная задача молекулярных биологов — поиск и анализ каких-либо конкретных генов. В большинстве случаев для этого достаточно иметь геномные библиотеки, созданные с помощью фаговых векторов λ EMBL3, λ 2001, λ ORF8 и λ FIX, а также с помощью фазмид типа λ pMYF131 (см. табл. 7.2). Размер вставки при этом не превышает 22 т.п.н. В некоторых случаях (сложная регуляторная система, много интронов) используют космиды, имеющие повышенную емкость (45 т.п.н.), в частности, космиды c2RB (см. рис. 7.10) и Lorist (Gibson *et al.*, 1987). Космиды типа Lorist обладают *ori*-сайтом фага λ , что обеспечивает независимость числа их копий от величины вставки и поэтому предотвращает сегрегацию клонов по размеру в процессе их амплификации. Однако приходится учитывать трудности, описанные в гл. 7, в частности: 1) космиды более чувствительны к качеству ДНК, взятой для клонирования; 2) упаковка в головки *in vitro* рекомбинантных космид менее эффективна, чем фаговой ДНК; 3) процесс селекции трансформантов, содержащих рекомбинантные космиды, более затруднен, чем прямой отбор рекомбинантных фагов; 4) банк в виде бактериальных клонов труднее хранить, чем фаговый; 5) скрининг легче проводить с фаговыми клонами, чем с бактериальными. Поэтому космиды применяют только в случаях, когда указанный размер вставки действительно необходим.

Отдельная задача — полный анализ генома, его физическое картирование и секвенирование. Здесь приходится начинать с клонирования как можно более крупных фрагментов с тем, чтобы облегчить процесс составления карты. Для этого используют дрожжевые векторы YAC (см. гл. 11). Они незаменимы также при анализе гигантских генов, таких как ген дистрофина, размер которого 1800 т.п.н. Перспективны векторы BAC, основанные на использовании *ori*-сайта плазмиды F и позволяющие клонировать фрагменты ДНК длиной до 300 т.п.н. (Shizuya *et al.*, 1992). Промежуточное положение занимают векторы, основанные на репликоне и системе упаковки фага P1.

Напомним, что в систему клонирования входят реципиентные клетки, причем для разных типов векторов рекомендуется свой штамм. Например, большие палиндромы клонируются в λ векторах, только если в клетках есть мутации *recB*, *recC* и *sbcB*.

Выделение и фрагментация ДНК. При любом способе выделения геномной ДНК ее концы имеют случайную структуру. Конечно, после фрагментации ее рестриктазами концевые фрагменты неспособны встраиваться в вектор, поскольку связываются с ним лишь одним краем. Чтобы свести к минимуму их конкуренцию за вектор, средняя длина фрагментов выделенной ДНК должна превосходить длину вставки, как минимум, в четыре раза.

ДНК млекопитающих обычно выделяют обработкой клеток протеиназой К в присутствии ЭДТА и SDS с последующей экстракцией фенолом. Этот метод позволяет получать ДНК со средним размером 100–150 т.п.н., т. е. он приемлем для конструирования банка генов только с использованием λ векторов. Молекулы ДНК длиной более 200 т.п.н. получают формамидным методом (Kupiec *et al.*, 1987), что достаточно для клонирования с помощью космид. Разработаны методы выделения ДНК со средним размером несколько миллионов пар нуклеотидов. В этих случаях лизис клеток и выделение ДНК ведут в агарозном геле. Также в геле проводят и ее последующую обработку рестриктазами до получения фрагментов размером 200–500 т.п.н., необходимых для клонирования в YAC'ах. Для получения геномных библиотек млекопитающих требуется около 200 мкг ДНК.

Первый банк генов был создан для клеток *E. coli* (Clarke, Carbon, 1976). Бактериальную ДНК авторы фрагментировали гидродинамическим способом, а встраивание фрагментов осуществляли через АТ-коннектор. Этот метод фрагментации ДНК обеспечивает статистически равномерное распределение точек разрывов по молекулам ДНК и позволяет регулировать средний размер фрагментов. Необходимость случайного дробления ДНК понятна. При этом, во-первых, нет опасности, что какой-нибудь ген не будет представлен в банке из-за его систематического расщепления (например, рестриктазой при полном гидролизе). Во-вторых, обеспечивается перекрывание клонируемых фрагмен-

тов, что важно для проведения “прогулки” по хромосоме, т. е. для перехода от одного фрагмента к соседнему с ним (см. с. 292). Однако эффективность клонирования фрагментов ДНК, полученных механическим дроблением, оказалась недостаточной для конструирования представительных библиотек из-за необходимости проведения дополнительных ферментативных обработок для их лигирования.

Для преодоления указанного недостатка было предложено для фрагментации выделенной ДНК проводить ее частичный перевар двумя мелкощепящими рестриктазами (Maniatis *et al.*, 1978). Авторы использовали рестриктазы *HaeIII* и *AluI*, узнающие тетра-нуклеотиды и образующие при разрезе ровные концы. Клонирование проводилось с применением линкеров, а вектором служил Харон λ Ch4A. При частичном гидролизе ДНК одной рестриктазой получается менее представительный банк, но существенно упрощается процедура его получения. С указанной целью широко используется рестриктаза *Sau3A*, образующая совместимые липкие концы с *BamHI*-концами.

Клонирование. Из данных табл. 9.1 видно, что для составления представительной геномной библиотеки необходимо собрать большое число клонов, достигающее для высших эукариот нескольких сотен тысяч и даже миллионов. Подчеркнем, что речь идет о клонах, содержащих рекДНК. Отсюда понятно, почему в системах клонирования, предназначенных для конструирования таких библиотек, серьезное внимание уделяется проблеме прямой селекции подобных клонов. Ни один из методов не абсолютен. По этой причине стараются поставить, как минимум, два барьера против клонов, не содержащих рекДНК. Одним из таких барьеров служит ограничение размера ДНК при ее упаковке в фаговые головки. Поэтому часто применяют векторы, сконструированные на базе ДНК фагов λ и P1.

Вектор замещения λ EMBL3, емкость которого составляет 7–20 т.п.н., приспособлен для клонирования *Sau3A*-рестриктов геномной ДНК. Буферный фрагмент вектора ограничен полилинкерами, содержащими сайты *BamHI*, *EcoRI* и *SalI* во взаимнообратном порядке (см. рис. 7.7). Этот фрагмент “вырезают” с помощью рестриктазы *BamHI* (рис. 9.1). Чтобы предотвратить возможность

его повторного встраивания в векторные молекулы, от него с помощью рестриктазы *EcoRI* отщепляют низкомолекулярные *Bam*HI-*Eco*RI-концевые участки, которые затем удаляют из реакционной смеси изопропанолом. Геномная ДНК подвергается частичному гидролизу рестриктазой *Sau*3A, а 5'-концы образовавшихся рестриктов дефосфорилируются.

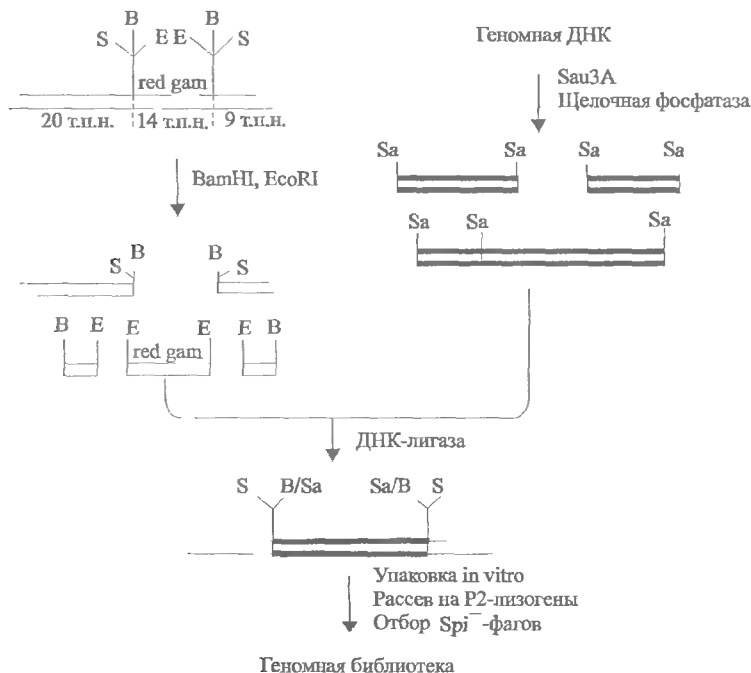


Рис. 9.1. Схема создания геномной библиотеки с помощью вектора λ EMBL3.

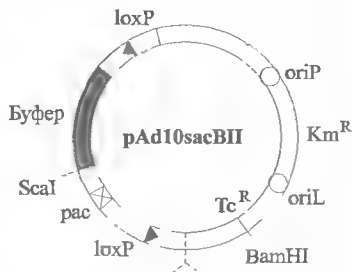
Сайты рестрикции: B — *Bam*HI, E — *Eco*RI, S — *Sal*I, Sa — *Sau*3A

После процедуры лигирования проводится упаковка ДНК *in vitro* в фаговые головки, причем из-за ограничений по размеру упаковывается только рекДНК. Дополнительный селективный фактор — отсутствие в рекомбинантных фагах генов *red* и *gam*, что позволяет их отбирать по *Spi*⁻ фенотипу, высевая на P2-лизогены

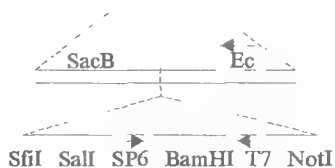
(см. гл. 4). Отметим, что сайты *Bam*HI в рекДНК не восстанавливаются, поэтому для вырезания встроенных фрагментов применяют рестриктазу *Sal*I.

Рис. 9.2. Вектор pAd10sacBII, предназначенный для прямой селекции клонов, содержащих рекДНК.

Направление *loxP*-сайта указано черной стрелкой. Промоторы: *Ec* — *E. coli*; SP6 — фага SP6; T7 — фага T7. Стрелки над промоторами указывают на направление транскрипции. Другие обозначения см. рис. 7.11



Вектор pAd10sacBII (вариант вектора pAd10; см. рис. 7.11) также обладает двумя системами прямой селекции. Во-первых, благодаря сайтам *loxP* рекДНК может быть упакована в головку фага P1. Во-вторых, селективным маркером служит бациллярный ген *sacB*, находящийся под промотором *E. coli* (рис. 9.2). Продукт этого гена превращает сахарозу в леван, губительный для кишечной палочки на средах, содержащих сахарозу. Между промотором и геном встроен полилинкер, в *Bam*HI-сайт которого встраивают *Sau*3A-рестрикты геномной ДНК. Процедура клонирования идет по схеме, представленной на рис. 7.11, с тем исключением, что инфицированные реконструированным фагом клетки высеваются на среду, содержащую кроме канамицина еще и сахарозу как единственный источник углерода. Отметим две особенности строения полилинкера. Во-первых, он ограничен сайтами для редкоцепящих рестриктаз *Sfi*I и *Not*I, позволяющими “вырезать” длинные вставки без риска их фрагментации. Во-вторых, по обе стороны от *Bam*HI-сайта, а значит, и от клонированного фрагмента, находятся фагоспецифические промоторы. Они дают возможность синтезировать *in vitro* РНК, комплементарные концам вставки, и использовать их как зонды для “прогулки” по хромосоме (см. с. 292).



При клонировании генов с использованием космид (см. рис. 7.9) предпочтение отдается также образованию рекДНК с участием рестриктаз *Bam*HI и *Sau*3A.

Способы работы с векторами YAC описаны в гл. 11. Здесь же отметим нестабильность получаемых с их помощью клонов. Например, в геномной энциклопедии *B. subtilis* в 10 % клонов были отмечены перестройки (Azevedo *et al.*, 1993).

Составление и хранение коллекции клонов. Отметим, прежде всего, что в зависимости от размера банк генов может состоять из индивидуальных клонов или из их смеси. Первое рационально для микроорганизмов, когда число клонов банка составляет несколько тысяч. Так был получен первый банк *E. coli* (Clarke, Carbon, 1976), состоящий из фрагментов ДНК в среднем по 14 т.п.н., клонированных в плазмиде ColE1 (строго говоря, это не банк, а клонотека, его полнота только 80 %). Получение банка в виде индивидуальных клонов необходимо, когда ставится задача составления геномной энциклопедии. В таких случаях число отбираемых клонов должно превышать указанные в табл. 9.1 числа в 7–10 раз, чтобы обеспечить необходимую точность при их физическом картировании.

Энциклопедией является геномная библиотека *E. coli* (Kohara *et al.*, 1987), составленная в результате анализа 3400 клонов, которые были получены с помощью векторов λ EMBL4 и λ 2001 (вектор λ EMBL4 отличается от λ EMBL3 обратным расположением полилинкеров, см. рис. 7.8). Полный банк представлен всего 476 клонами, хранящимися в международных и национальных коллекциях, в том числе в России (ГНИИГенетика, Москва). Он и сейчас применяется для поиска и изучения генов *E. coli*.

С помощью вектора pAd10*sac*ВII получена геномная энциклопедия патогенного для человека микроба *Pneumocystis carinii* (Metcheva *et al.*, 1996), размер генома которого 10000 т.п.н. Коллекция состоит из 4800 индивидуальных клонов. Авторы отмечают стабильность своей библиотеки.

Наиболее стабильно и длительно хранятся банки, полученные с помощью λ -векторов. Реконструированные *in vitro* рекомбинантные фаги быстро инактивируются, поэтому их немедленно рассеивают с плотностью около 100 негативных колоний на 1 кв. см (5–10 тысяч на чашку Петри). Чашки инкубируют 8–10 часов при 37 °С, не

позволяя образующимся негативным колониям перекрываться. Далее фаги экстрагируют буфером и после центрифугирования хранят под хлороформом при 4 °С многие годы. По-видимому, “вечен” способ хранения фагового банка при –70 °С в “мягком” агаре в 30%-ном глицерине (Klinman, Cohen, 1987). Амплификация банка необходима для хранения библиотеки или повторного скрининга. Однако при повторных пересевах представительность банка ухудшается из-за различий в скоростях размножения клонов, что обусловлено особенностями их нуклеотидных последовательностей и разницей в длине вставки. Поэтому некоторые исследователи предпочитают каждый раз получать геномную библиотеку в фагах заново.

Коллекция бактериальных клонов, содержащих рекомбинантные космиды, получается сходным образом. Выросшие на селективных чашках микроколонии (20–30 тысяч на чашку) объединяют и хранят в среде с глицерином при –70 °С, распределив предварительно в несколько десятков пробирок. Каждая пробирка используется после оттаивания единожды для скрининга или для других процедур. Конечно, и в этом случае возможен немедленный скрининг банка без его амплификации, для чего инфицированные бактерии высевают сразу на гибридизационные фильтры (см. с. 280).

Банк кДНК. кДНК играют важную роль в исследованиях по молекулярной биологии эукариот. Они представляют собой гены без интронов, необходимые для экспрессии эукариотических генов в бактериях, а также для получения информации о кодирующей части гена (напомним, что кДНК не содержит регуляторных элементов генов). Анализ кДНК применяют для изучения клеток, по какой-либо причине меняющих активность своих генов. Зачастую кДНК служат также зондами. Например, если в геномном банке нужно найти методом гибридизации клон с заданным геном, а специфическая мРНК представлена в малом количестве, то сначала синтезируют кДНК, клонируют ее, метят и используют для скрининга.

Выделение и очистка доминирующей мРНК из высокоспециализированных клеток являются относительно простой задачей, что позволяет сразу синтезировать индивидуальную кДНК. Такие кДНК можно клонировать в векторах типа M13mp и при необходимости сразу их секвенировать. кДНК для редко встречающихся мРНК можно получить только скринингом банка кДНК.

Банком кДНК называют коллекцию ДНК-копий мРНК клеток конкретной ткани на определенной стадии развития организма. Типичная клетка млекопитающих содержит от 10 до 30 тысяч разных мРНК со средним размером 1,5–2 тысячи нуклеотидов, треть из которых представлена низким числом копий (менее 10–15 на клетку). Именно эти редкие мРНК определяют, какое число клонов кДНК необходимо отобрать, чтобы банк был представительным. Для вероятности 99 % это число близко к 200000.

Успех синтеза полноразмерных кДНК зависит от качества выделенной суммарной мРНК. Классический метод образования второй нити кДНК с применением нуклеазы S1 (см. рис. 6.1) заменен более эффективными. В одном из них в дуплексе мРНК : кДНК с помощью РНКазы H вносятся надрезы и бреши в нить РНК (рис. 9.3, а). Образовавшиеся фрагменты мРНК служат праймерами для реакции ник-трансляции, в результате которой ДНК-полимераза I почти полностью заменяет РНК на ДНК (Okayama, Berg, 1982). Не заменяются лишь несколько нуклеотидов на 5'-конце мРНК. Если информация об этих нуклеотидах важна, то синтез второй нити кДНК праймируют с помощью олигонуклеотида (dG)_n, для чего предварительно после гидролиза мРНК на 3'-конце первой нити кДНК наращивают короткую цепочку поли(dC) (рис. 9.3, б; Land *et al.*, 1981).

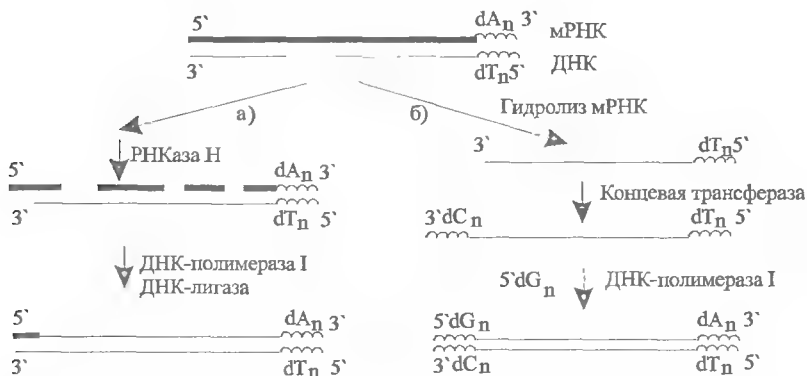


Рис. 9.3. Схемы синтеза второй нити кДНК методом ник-трансляции (а) и праймированием с помощью олигонуклеотида (б)

Небольшой размер кДНК позволяет вести ее клонирование в плазмидных векторах, однако для получения банков предпочитают использовать λ векторы, что облегчает хранение рекДНК. Наиболее удобны векторы λ gt11, λ ORF8 и λ ZAP (см. рис. 7.7), так как они приспособлены для экспрессии клонированных кДНК. Синтезированные двунитевые кДНК обрабатываются ДНК-полимеразами с целью образования у них ровных концов. Затем их инкубируют в присутствии ДНК-лигазы фага Т4 и большого молярного избытка (в 100 раз) подходящих линкеров, обрабатывают соответствующей рестриктазой и, очистив от линкеров, лигируют по липким концам с вектором. Для предотвращения олигомеризации кДНК в процессе лигирования необходим высокий молярный избыток векторных молекул по отношению к кДНК. При этом повышается вероятность объединения плеч вектора, поэтому их концы до лигирования приходится дефосфорилировать.

Для образования липких концов при создании банка кДНК следует предпочесть редкощепящие рестриктазы, так как велика вероятность того, что многие молекулы кДНК будут содержать сайты рестрикции для обычных рестриктаз. Конечно, возможно проведение их предварительной модификации с помощью одноименных сайт-специфических метилаз. В качестве альтернативы используют адаптеры вместо линкеров. В этом случае отпадает необходимость обрабатывать кДНК рестриктазой. Можно даже избежать процедуры присоединения линкера/адаптера к кДНК, добавив последовательности, кодирующие сайты рестрикции, в 5'-концы праймеров олиго(dT) и олиго(dG) при их синтезе. Если эти сайты разные, то появляется возможность направленной встройки кДНК в вектор, что особенно важно для их экспрессии.

Создан вектор, позволяющий без переклонирования: 1) получать банки полноразмерных кДНК, 2) определять их нуклеотидную последовательность и 3) транслировать каждую кДНК *in vitro* или *in vivo* (Kato *et al.*, 1994).

Скрининг банка генов

Существует несколько методов скрининга, т. е. поиска в геномной библиотеке или в банке кДНК тех клонов (бактериальных или фаговых), которые содержат рекДНК с заданным геном.

Из них основные — гибридизационный, иммунологический, генетический и рекомбинационный. Выбор метода во многом зависит от использованной системы клонирования. В случае клонирования эукариотической ДНК в клетках *E. coli* единственным “паспортом” чужДНК служит ее нуклеотидная последовательность. Этот “паспорт” присутствует при всех способах клонирования, поэтому общий метод скрининга — гибридизация рекДНК с зондами, т. е. с нуклеотидными последовательностями (олигонуклеотидами, одноклеточными кДНК или мРНК), которые комплементарны отыскиваемому гену. На практике для этого пользуются методом гибридизации колоний (Grunstein, Hogness, 1975). Если клонируемые гены экспрессируются (некоторые банки кДНК; клонированные в *E. coli* геномные банки клеток кишечной группы, их фагов и плазмид), то для скрининга применяют иммунологические и другие методы, регистрирующие присутствие специфического белка.

Метод гибридизации колоний. Метод заключается в следующем (рис. 9.4). На чашки Петри с плотной средой помещают стерильные нитроцеллюлозные фильтры и стандартным способом наносят на них бактериальные клетки, содержащие рекДНК. Питательная среда свободно диффундирует через фильтр, и на нем образуются колонии клеток. С них делают перепечатки на чашки с аналогичной средой и таким образом получают “справочную” библиотеку клонов, из которой берут затем клетки с искомыми рекДНК. Далее фильтры с чашек переносят на листы ватмана, смоченные в 0,5 н NaOH, где клетки лизируются, а освободившаяся ДНК денатурируется. После этого фильтры обрабатывают протеиназой К для удаления белков, выдерживают при 80 °С для фиксации ДНК на фильтрах, затем промывают последовательно буферным раствором (рН 7,6) и хлороформом. Далее их сушат и приступают к самой процедуре гибридизации. Для этого фильтры смачивают в цитратном буфере, содержащем 50 % формамида и меченный радиоактивным фосфором зонд, и выдерживают 15–20 ч при 42 °С под слоем масла. После отмывки формамида и радиоактивности нейтральным буфером остатки негибридизовавшегося зонда гидролизуют нуклеазой S1. Далее фильтры вновь промывают, подсушивают и автораддиографируют на рентгеновских пленках при –70 °С. Проявленные рентгеновские пленки совмеща-

ют с контрольными чашками из “справочной” библиотеки клонов. Пятна на пленках позволяют выявить на чашках те колонии, которые содержат рекДНК. Отметим, что все большее распространение получают и нерадиоактивные метки.

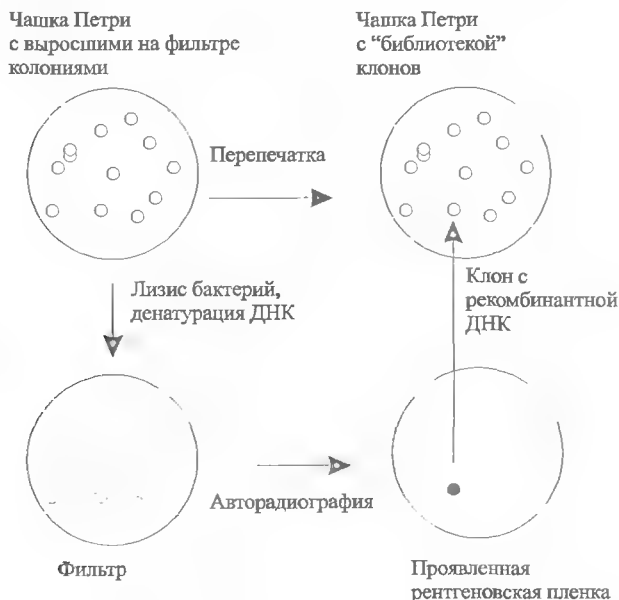


Рис. 9.4. Поиск клонов с рекомбинантными молекулами ДНК методом гибридизации колоний

Данный метод используется также для поиска определенных клонов среди фаговых негативных колоний (до 50 тысяч на одной чашке Петри). Однако в отдельной негативной колонии недостаточно фаговой ДНК для ее проявления при авторадиографии. Поэтому в данном случае вначале проводят амплификацию фагов: стерильные нитроцеллюлозные фильтры смачивают в суспензии индикаторных бактерий, содержащей около 10^8 клеток в 1 мл, подсушивают на листе ватмана, наносят на чашки с негативными фаговыми колониями и помещают в холодильник. После 30 мин выдержки, позволяющей фагам диффундировать в фильтры, их переносят на свежие чашки с питательной средой и инкубируют в

течение 12 ч при 37 °С. За это время на поверхности фильтров образуется газон индикаторных бактерий с копиями негативных колоний, содержащими повышенное число фагов. Далее описанным ранее способом осуществляют гибридизацию колоний, слегка варьируя условия опыта. Благодаря амплификации фагов время автордиографии значительно сокращается (до нескольких часов). С одной чашки можно сделать несколько перепечаток фильтрами, что позволяет проводить параллельные опыты с тем же или другими зондами. “Справочной” библиотекой клонов служат чашки с первичными негативными колониями.

В качестве зондов для гибридизации колоний, как правило, используют синтетические олигонуклеотиды определенной длины. Длина таких зондов зависит от размера анализируемого генома. Согласно вероятностным расчетам, для поиска бактериальных или дрожжевых генов в геномных библиотеках достаточно 15-членного олигонуклеотида, а для поиска генов животных или растений — 18-членного. Это те минимальные размеры последовательностей, которые встречаются в названных геномах только один раз. На практике используют олигонуклеотидные зонды, содержащие не менее 20 нуклеозидных остатков. Конечно, их синтез возможен, если известно строение гена или, как минимум, соответствующего белка либо его части. Но из-за вырожденности кода восстановить адекватную нуклеотидную последовательность по аминокислотной последовательности нельзя. Поэтому для синтеза зонда выбирают такую часть гена, в которой преимущественно находятся кодоны уникальных (Met, Trp) или «безопасных» (Asn, Asp, Cys, His, Phe, Tyr, Gly, Glu, Lys) аминокислот. В последнем случае ошибки в выборе кодонов приводят только к замене пурина на пурин или пиримидина на пиримидин. Это наименьшим образом дестабилизирует дуплекс зонд-ген в процессе гибридизации. Тем не менее, для компенсации ослабления водородных связей в дуплексе длину таких олигонуклеотидных зондов увеличивают. Другой выход заключается в синтезе набора зондов стандартной длины, в котором представлены все возможные варианты строения зонда. С целью скрининга используют комбинацию всех вариантов.

Ясно, конечно, что зонды могут гибридизоваться не только с целым геном, но и с его частью. Поэтому положительный результат скрининга методом гибридизации не означает, что во всех выявленных колониях содержится целый ген.

Возможен направленный поиск в банке кДНК только тех генов, которые участвуют в определенном процессе, например, индуцируются действием какого-либо гормона. В этом методе, носящем название вычитательная гибридизация, сначала синтезируют первые нити кДНК суммарной мРНК, выделенной из индуцированных клеток. Затем образовавшуюся одонитевую кДНК гибридизуют с суммарной мРНК, выделенной из неиндуцированных клеток. Сформировавшиеся дуплексы мРНК:кДНК удаляют, а негибридизовавшиеся кДНК используют для синтеза двунитевых кДНК, которые и являются целью поиска (см. обзор Свердлов, 1993).

Иммунологические методы. Эти методы применяют для выявления определенных клонов с рекДНК, если клонируемые гены экспрессируются. Напомним, что молекулы белков имеют по несколько антигенных детерминант (эпитопов), на каждый из которых в организме животных вырабатывается свое антитело (специфический иммуноглобулин). Сыворотки, получаемые стандартными методами, поликлональны, т. е. содержат антитела ко многим эпитопам данного белка. Возможно получение и моноклональных антител, если использовать гибридомы (см. рис. 5.8). Хотя моноклональные антитела при скрининге дают небольшой фон ошибочных положительных ответов, используют обычно поликлональные антитела. Это связано с тем, что детектируемый белок может иметь в чем-то измененную структуру или присутствовать в виде фрагмента.

Для поиска нужного клона среди небольшого числа колоний применяют метод прямой иммуноселекции. Он предельно прост. На чашки с питательной средой, в которую добавлены антитела к детектируемому белку, высеваят клетки, содержащие рекДНК. После образования колоний клетки лизируют и подвергают инкубации. В результате вокруг колоний, содержащих определяемый белок, появляются кольца иммунопреципитации. Лизис клеток осуществляют с помощью фага или лизоцима. В первом случае клетки вначале лизогенизируют фагом λ сI857 и выращивают при-

30 °С. Затем вызывают их лизис индукцией профага при 42 °С. Во втором случае клетки в колониях инактивируют парами хлороформ-а и заливают «мягким» агаром, содержащим ЭДТА и лизоцим.

Метод радиоиммунотестирования, в котором метка ^{125}I вводится в белки *in vitro*, позволяет выявлять нужные клоны среди 10–20 тысяч колоний на одной чашке Петри. Ранее он основывался на применении поливиниловых дисков, с которыми иммуноглобулины прочно связываются (Broome, Gilbert, 1978). В современных методах радиоиммунотестирования осуществляется на нитроцеллюлозных фильтрах (Hanahan, Meselson, 1980). Удобно проводить скрининг банков, полученных с помощью экспрессирующих векторов типа $\lambda\text{gt}11$ (Young, Davis, 1983). Это делает возможным анализировать непосредственно фаги (что более эффективно) или лизогенные бактерии.

Напомним, что в векторе $\lambda\text{gt}11$ (см. рис. 7.7) чужДНК вставляется в начало гена *lacZ*, поэтому рекомбинантный фаг синтезирует гибридный (“слитый”) белок, находящийся под контролем Lac-репрессора. Фаги из банка генов засевают с плотностью 20 тысяч на чашку на клетки *E. coli* Y1090*hsdR*, содержащие плазмиду рМС9, которая кодирует Lac-репрессор (рис. 9.5,а). Репрессор предотвращает преждевременную экспрессию клонированного гена, оберегая тем самым инфицированные клетки от потенциально токсичных продуктов. Чашки инкубируют 3–4 часа при 42 °С до образования фаговых микроколоний, после чего их покрывают нитроцеллюлозными фильтрами, смоченными в растворе изопропил-β-D-тиогалактозида (IPTG; индуктор *lac*-оперона), и дополнительно инкубируют 4 часа при 37 °С. Эта процедура способствует выходу белков из лизируемых бактерий и связыванию их с фильтрами. Далее фильтры снимают с чашек, промывают специальными буферами и выдерживают 2–4 часа в буфере со специфическими иммуноглобулинами. При этом соответствующие антигены связываются с антителами. Наконец, фильтры отмывают от несвязавшихся антител. Положение комплексов антиген-антитело на фильтрах и, следовательно, координаты колоний, синтезирующих специфический продукт, определяют автордиографически после обработки фильтров мечеными иодом-125 “вторичными” антителами с той же специфичностью или меченым белком *A Staphylococcus aureus*, который способен связываться с

константными областями иммуноглобулинов. Проявившиеся на автордиограмме пятна соотносят с положением колоний на сохранившейся исходной чашке.

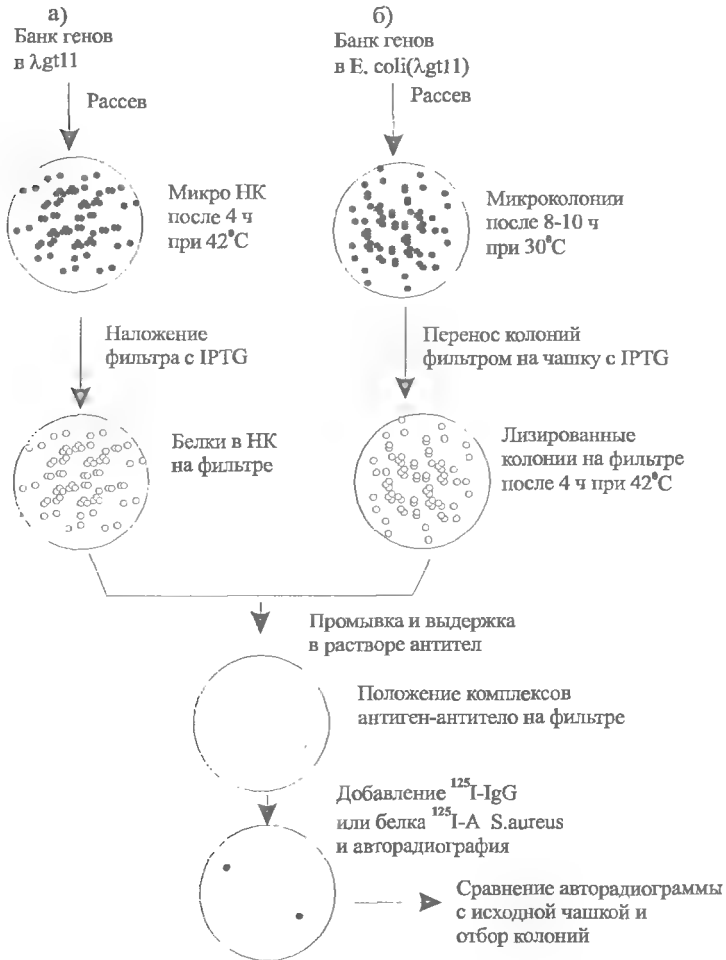


Рис. 9.5. Радиоиммунодетекция рекомбинантных клонов вектора λ gt11 из фагового (а) и бактериального (б) банков НК — негативные колонии

Процедура скрининга банка генов, представленного в виде клеток, лизогенизованных рекомбинантными фагами, сходна с вышеописанной. Клетки из банка генов рассеивают с плотностью 20 тысяч на чашку и чашки инкубируют при 30 °С до образования микроколоний (рис. 9.5,б). Колонии перепечатают на нитроцеллюлозные фильтры, а фильтры помещают на свежие чашки, содержащие IPTG, и дополнительно их инкубируют 2–4 часа при 42 °С. Затем клетки обрабатывают парами хлороформа, что вызывает лизис клеток и выход белков. Дальнейшие этапы скрининга полностью аналогичны описанным ранее.

Отметим, что для детекции антител разработаны также и нерадиоактивные (хромогенные) методы. Они основаны на свойствах пероксидазы из хрена и щелочной фосфатазы образовывать цветные нерастворимые продукты в процессе ферментативной реакции. Эти ферменты ковалентно связывают с “вторичными” антителами, которые реагируют со специфическими сайтами на первичных антителах. После обработки фильтров такими комплексами в местах локализации искомого белка образуются суперкомплексы антиген — антитело — фермент. Их положение определяют, смочив фильтр в растворе проявляющего вещества (субстрата фермента). Например, для пероксидазы хрена хромогенным субстратом является 4-хлоро-1-нафтол, способствующий появлению на фильтрах пурпурных пятен. В качестве альтернативного метода “вторичные” антитела связывают с биотином, а пероксидазу хрена — с авидином.

Генетический метод возможен, когда клонируемый ген с собственным промотором взят от организма, родственного реципиентным клеткам, и поэтому ожидается его экспрессия. В таком случае, если ген селективен и его признак носит доминантный характер, то соответствующие клоны отбирают непосредственно в селективных условиях. Так, при клонировании в плазмиде pBR322 гена *cor*, ответственного за фаговую конверсию, вызываемую фагами φ80 и N15, нужные клоны отбирали как клетки, устойчивые к фагу T1, поскольку ген *cor* придает им такой фенотип. Если клонируемые гены участвуют в клеточном метаболизме, то реципиентные клетки должны быть дефектными по соответствующему гену, и отбор клонов осуществляют по эффекту генетической комплементации.

Рекомбинационный метод основан на использовании гомологической рекомбинации в *E. coli* между зондом, интегрированным в плазмиду, и рекомбинантным фагом (Seed, 1983). Тестирующая последовательность (гомологичная отыскиваемой) длиной не менее 60 п.н. предварительно внедряется в вектор $\pi V\lambda$ (902 п.н.), который содержит полилинкер и ген-супрессор *supF*. Геномная библиотека, подвергаемая скринингу этим методом, должна быть сконструирована на базе λ -векторов, имеющих супрессор-чувствительные мутации. К таким векторам относятся, например, λ Ch4A и λ EMBL3A, содержащие амбер-мутации в генах *A* и *B* (см. рис. 7.7). Фаги, составляющие библиотеку, сначала пассируют на клетках *E. coli* Rec⁺, трансформированных рекомбинантной плазмидой $\pi V\lambda$, где с большой вероятностью плазида интегрируется в фаговые геномы, имеющие подходящие гомологичные участки (рис. 9.6). После этой процедуры фаги рассеивают на клетках *E. coli* sup⁰, в которых развиваются только те из них, которые приобрели ген *supF* и, соответственно, содержат отыскиваемый ген.

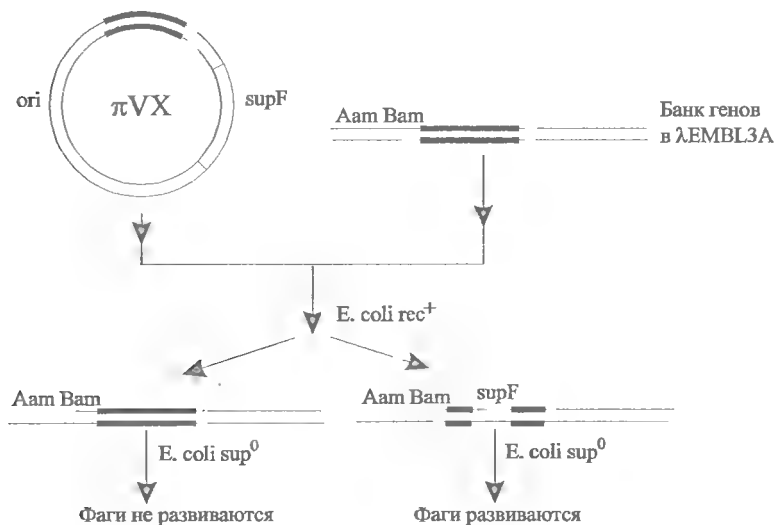


Рис. 9.6. Схема рекомбинационного метода скрининга банка генов, сконструированного на базе вектора λ EMBL3A. Жирной линией выделена отыскиваемая последовательность

Подчеркнем в заключение, что описанные методы скрининга — это лишь способ поиска клонов, которые могут содержать целый ген и в которых возможен синтез интактных белков. Судить о целостности клонируемого гена и синтезируемого белка можно только после дополнительного анализа (как правило, после секвенирования).

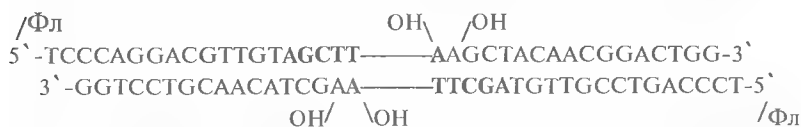
Физическое картирование ДНК

Физической картой молекулы ДНК называют взаимное расположение на ней сайтов рестрикции для различных рестриктаз с известными расстояниями между ними или, что то же, установленный порядок клонированных фрагментов. Физически картировать какой-либо ген или какой-либо фрагмент на молекуле ДНК означает определить его положение на этой молекуле в физических единицах, измеряемых обычно числом пар нуклеотидов. Точнейший способ составления физической карты любой ДНК — ее полное секвенирование. У линейной молекулы ДНК отсчет ведут от одного из ее концов, а у кольцевых молекул — от какого-либо удобного единичного сайта рестрикции.

Традиционный способ анализа рестриктов гель-электрофорезом описан в приложении. Расположение зон, зафиксированное на фотографии или авторадиограмме, для анализируемой молекулы ДНК является своеобразным паспортом. С введением в практику флуоресцентных меток регистрацию результатов гель-электрофореза удалось автоматизировать (Carvano *et al.*, 1989). Хотя введение такой метки — достаточно трудоемкий процесс, метод оправдывает себя при необходимости проводить массовую “паспортизацию” фрагментов ДНК. Метку (Фл) присоединяют ковалентно к 5'-концу какого-либо стандартного праймера и “отжигают” его с комплементарным олигонуклеотидом, 5'ОН-конец которого является липким для используемой в эксперименте рестриктазы (в нашем примере *Hind*III). К образовавшимся меченым дуплексам добавляют рестрикты (выделены жирным шрифтом)



и их лигируют. Дуплексы присоединяются к обоим концам рестриктов, причем в каждой нити содержится по одному нику:



В реальном эксперименте “отжиг”, гидролиз анализируемой ДНК и лигирование ведут одновременно в одной пробирке. Далее меченые рестрикты денатурируют:



и разделяют гель-электрофорезом в денатурирующих условиях. Регистрирующее устройство находится в определенном месте и фиксирует зоны по мере их прохождения. На одной дорожке можно разделять рестрикты, образованные разными рестриктазами, если их метят различными красителями. С помощью этого метода достигается высокая точность определения размеров рестриктов, потому что все они (включая реперные) идут по одной дорожке и проходят до регистрации одинаковые расстояния. Данные анализа поступают в компьютер, который и выдает информацию о физической карте анализируемой ДНК.

Плазмидные и вирусные ДНК. Картирование обычно начинают с использования рестриктаз, которые расщепляют ДНК на небольшое число фрагментов. Порядок рестриктов легко устанавливается из анализа результатов одновременного перевара ДНК двумя рестриктазами или ее неполного гидролиза одним ферментом. Из этих же данных делается вывод о циркулярности или линейности анализируемой молекулы ДНК. При действии одной рестриктазы на кольцевую ДНК число рестриктов равно числу сайтов рестрикции, а у линейной молекулы оно на единицу больше. При действии двух рестриктаз на кольцевую ДНК число рестриктов равно суммарному числу рестриктов, найденному для одиночных переваров, а у линейной молекулы в этом случае суммарное число рестриктов на единицу меньше.

Установим, например, структуру и построим физические карты для двух препаратов плазмид (рис. 9.7). В варианте "а" прежде всего обращаем внимание на то, что при двойном переваре сумма длин фрагментов меньше, чем при одиночных переварах (11 вместо 12 т.п.н.). Кроме того, зона, соответствующая рестрикту длиной 1 т.п.н., более интенсивно прокрашена. Это свидетельствует о присутствии в этом переваре двойного количества таких рестриктов. Общее число рестриктов ($5=2+3$) говорит о циркулярности плазмиды. Легко устанавливается, что больший R1 рестрикт расщепляется на 3 фрагмента ($9=5,5+2,5+1,0$), а меньший — на два

а)

б)

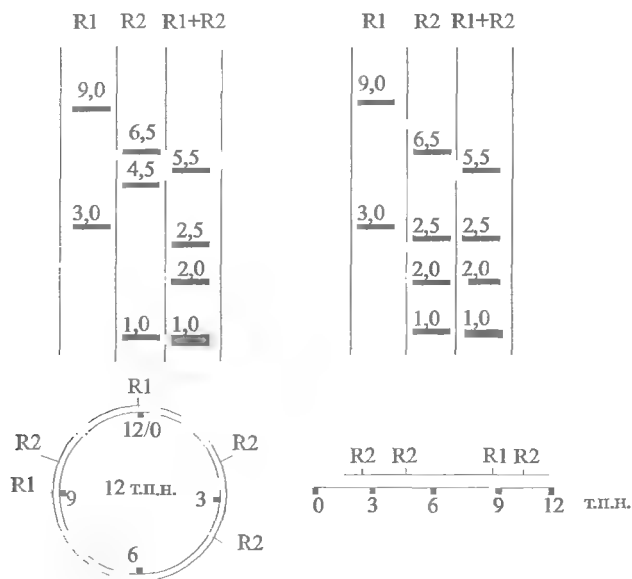


Рис. 9.7. Физическое картирование ДНК методом двойного перевара рестриктазами.

Представлены электрофореграммы одиночных и двойных переваров ДНК рестриктазами R1 и R2 для двух препаратов ДНК. Результаты анализа представлены в виде карт кольцевой (а) и линейной (б) ДНК

(3,0=2,0+1,0). Большой R2 рестрикт расщепляется на фрагменты 6,5=5,5+1,0, а средний — на фрагменты 4,5=2,5+2,0. Отсюда ясен порядок следования рестриктов двойного перевара (2,5—1,0—5,5—1,0—2,0; от начала координат по часовой стрелке) и самих сайтов рестрикции (R1-R2-R2-R1-R2). Легко подсчитываются и расстояния между этими сайтами. В варианте “б” аналогичные данные и те же аргументы свидетельствуют о линейности анализируемой плазмиды (при двойном переваре число рестриктов меньше суммарного числа рестриктов при одиночных переварах). Несложные рассуждения позволяют установить, что в данном случае препарат ДНК представляет собой ту же плазмиду, но линейаризованную через R1-сайт в начале координат.

Порядок рестриктов у линейных молекул ДНК можно установить также, анализируя результаты частичного перевара ДНК, если предварительно идентифицированы концевые рестрикты. Концы молекул метят каким-либо способом до их обработки рестриктазами, а затем после разделения рестриктов гель-электрофорезом выявляют концевые фрагменты с помощью автордиографии. Для картирования сайтов рестрикции в чужДНК, клонированной в каком-либо векторе, можно использовать свойство нуклеазы *Bal31* укорачивать в регулируемых условиях дуплексы ДНК с двух сторон (см. гл. 6). Для этой цели необходимо предварительно линейаризовать рекДНК через сайт на стыке чужДНК и вектора. Далее из реакционной смеси, содержащей эту ДНК и нуклеазу, через определенные промежутки времени отбирают пробы, обрабатывают их заданной рестриктазой и полученные рестрикты анализируют гель-электрофорезом. По мере действия нуклеазы рестрикты исчезают в том же порядке, в каком они находятся по отношению к концам линейаризованной рекДНК. Задача решается однозначно, поскольку порядок сайтов рестрикции в векторе заранее известен.

Суммирование длин фрагментов, полученных с использованием разных рестриктаз, должно дать близкие значения. Заметное отступление какого-либо отдельного результата от средней величины свидетельствует о наличии мелких неидентифицированных фрагментов или о совпадении электрофоретических подвижностей у разных фрагментов. Мелкие фрагменты можно выявить на

авторадииограмме, осуществив концевое мечение ДНК после действия рестриктазы и используя более плотный гель (см. приложение). Совпадение длин у двух разных рестриктов приводит к более интенсивной прокраске их общей зоны на электрофореграмме.

Для картирования часто встречающихся сайтов рестрикции используют другие методы. В одном из них проводят мечение только одного конца молекулы ДНК и обрабатывают ее рестриктазой в таких условиях, когда молекула расщепляется только в одном сайте. При этом в пробирке образуется набор фрагментов ДНК, длины которых отличаются друг от друга только на размер одного рестрикта (рис. 9.8). Порядок сайтов рестрикции и расстояние между ними можно оценить по анализу авторадииограммы геля.

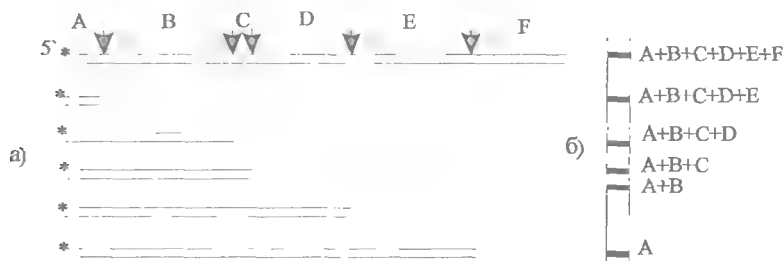


Рис. 9.8. Физическое картирование ДНК методом неполного перевара рестриктазой: а — порядок сайтов рестрикции и фрагменты, образующиеся при неполном переваре ДНК; б — авторадииограмма меченых (*) фрагментов после гельэлектрофореза

Для построения физических карт ДНК крупных плазмид или вирусов прежде всего конструируют банк генов, клонируя фрагменты, полученные частичным гидролизом ДНК мелкощепляющими рестриктазами. Установление порядка фрагментов проводят методом так называемой “прогулки по хромосоме”, при которой с помощью гибридизации осуществляют последовательный поиск в банке тех клонов, которые перекрывают уже картированные клоны (Bender *et al.*, 1983). Для этой цели очень удобны векторы, у которых на концах полилинкеров находятся фагоспецифические промоторы, например, λ DASH или λ FIX (см. рис. 7.7), а также космиды pWE15 и pWE16 (Wahl *et al.*,

1987). РекДНК обрабатывают мелкощепящей рестриктазой, а рестрикты транскрибируют *in vitro* подходящей фаговой РНК-полимеразой. Меченый транскрипт и служит зондом для поиска соседнего фрагмента, перекрывающегося с предыдущим (рис. 9.9). Так можно “прогуляться” на расстояния, не превышающие нескольких сотен тысяч пар нуклеотидов, поскольку шаги при “прогулке” определяются размером вставки. Концы молекул метят каким-либо способом до их обработки рестриктазами, а затем после разделения рестриктов гель-электрофорезом выявляют концевые фрагменты с помощью авторадиографии.

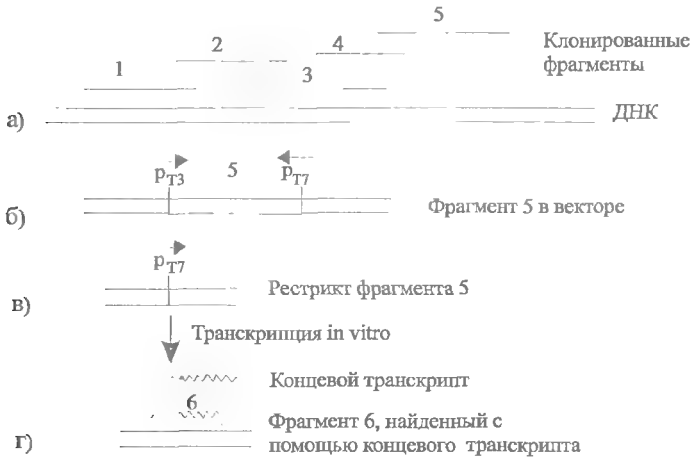


Рис. 9.9. Схема физического картирования ДНК методом “прогулки по хромосоме” (а) и последовательные этапы поиска следующего клона (б, в, г)

Хромосомы. Важная процедура программы полного генетического анализа какого-либо сложного генома — построение физической карты каждой хромосомы. Достаточно простым, но грубым, является метод гибридизации хромосом *in situ*, если имеется возможность приготовить молекулярный зонд для картируемого гена. Его разрешение — 10^7 – 10^8 п.н. Уточнение картирования осуществляется по мере клонирования все более мелких фрагментов (рис. 9.10). Такие фрагменты используют и для дальнейших

шагов по секвенированию хромосомы (и всего генома), и для выделения какого-либо конкретного гена.

Физические карты хромосом ценны в сочетании с их генетическими картами. Ранее генетическое картирование было возможно лишь в случаях, когда гены обладали легко определяемым фенотипом, что достаточно редко. Существенно расширило возможности генетического картирования введение в практику метода, основанного на явлении полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Это явление вызвано наличием в геномах индивидуальных особей множественных структурных различий.

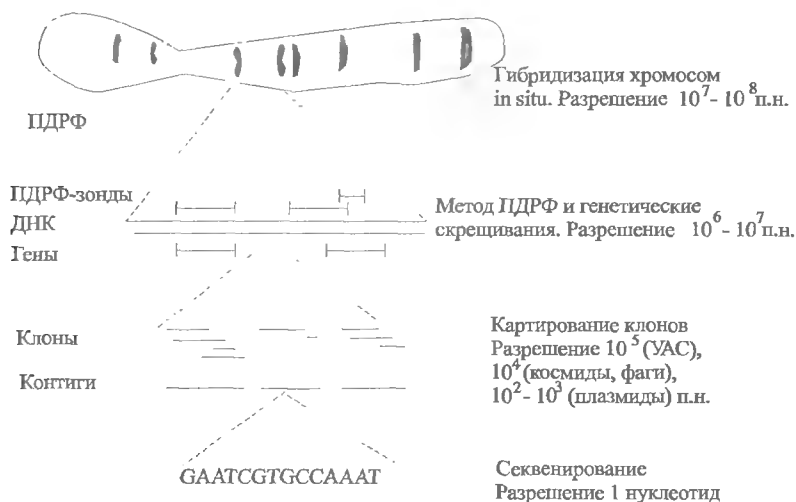


Рис. 9.10. Хромосомные физические карты на разных уровнях разрешения

Наиболее распространенная причина появления ПДРФ — точечные мутации, делеции, вставки и инверсии, приводящие к исчезновению одних и образованию других сайтов рестрикции. В итоге гомологичные геномные фрагменты, образующиеся при гидролизе ДНК соответствующими рестриктазами, будут иметь разную длину. Разницу в длинах рестриктов можно выявить на электрофореграммах с помощью гибридизационных зондов блотингом по Саузерну (см. прило-

жение). Перечисленные ранее изменения происходят в случайных местах, но выявляться будут те рестрикты, для которых имеется зонд. При наличии подходящих праймеров возможен и другой подход: анализируемая область ДНК мультиплицируется с помощью полимеразной цепной реакции (см. приложение), и после гидролиза ее заданной рестриктазой образовавшиеся фрагменты ДНК анализируются гелем электрофорезом. ДНК-зонд и праймеры, а также выявляемый ими ПДРФ в совокупности представляют собой систему маркирования определенного локуса, за наследованием которого можно следить.

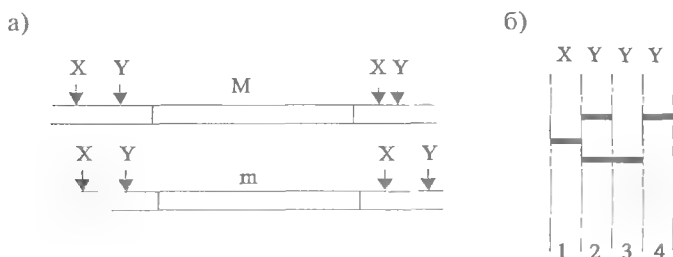


Рис. 9.11. Схема, поясняющая причину возникновения полиморфизма длин рестрикционных фрагментов: а — сайты действия рестриктаз X и Y около аллелей M и m; б — электрофореграммы результатов перевара ДНК диплоидных клеток, имеющих разный генотип, рестриктазами X и Y; 1 — рестрикт X для обеих аллелей; 2 — гетерозиготность по гену M; 3 — гомозиготность по аллели M; 4 — гомозиготность по аллели m. Зоны выявлены с помощью меченого зонда к гену

Для картирования генов важны случаи, когда изменения в сайтах рестрикции происходят в самих генах или достаточно близко от них, что дает возможность различать их аллели. Допустим, аллели некоторого гена M, присутствующего в соматической клетке, “вырезаются” одинаково рестриктазой X и по разному — рестриктазой Y. Разницу в длинах рестриктов выявляют с помощью зондов к этому гену (рис. 9.11). В данном примере видно, что ген M полиморфен по отношению к рестриктазе Y. Такой же анализ, проведенный с ДНК родителей, позволяет определить происхождение тестируемой аллели у данной особи.

Описанные ПДРФ-маркеры являются диморфными, так как маркируют только два аллельных состояния — наличие сайта рестрикции или его отсутствие. По этой причине они малопригодны для генетического анализа, поскольку, по крайней мере, половина всех особей гомоаллельны по такому маркеру. Более информативен полиморфизм маркеров, вызванный существованием tandemно повторяющихся участков в некодирующих областях ДНК эукариот. Например, в геноме человека GC-богатые участки длиной 10–40 пар нуклеотидов могут повторяться до тысячи раз в данном локусе, образуя так называемый минисателлит. Длинные гомологичные участки, состоящие из повторов, подвержены рекомбинации, происходящей, как правило, вследствие неравного обмена при мейозе или митозе или вследствие ошибок при репликации ДНК. Поэтому минисателлиты в определенных локусах у разных неродственных особей отличаются по числу повторов, т. е. они полиморфны. Подбором подходящих рестриктаз, которые расщепляют ДНК по обе стороны минисателлита, но не внутри него, различия в числе повторов могут быть выявлены как разница в длине рестриктов.

Минисателлиты существуют в виде разбросанных по всему геному семейств, родство членов которых определяется гомологией с некоторой базовой последовательностью. Клонированные участки минисателлитов используют для приготовления зондов, с помощью которых при гибридизации в мягких условиях выявляют в геномной ДНК их множественные аллели. Один зонд с помощью блотинга по Саузерну позволяет наблюдать одновременно за наследованием нескольких десятков минисателлитов, расположенных в разных локусах, но относящихся к одному семейству. Минисателлиты достаточно коротки, вследствие чего их длина в данном локусе относительно стабильна в ряду нескольких поколений. Поэтому они могут служить маркерами и позволяют проводить сегрегационный анализ и, кроме того, облегчают картирование сцепленных с ними генов.

Метод ПДРФ особенно удобен как экспрессный способ выявления генетических дефектов у людей (см. гл. 15). На основании данных по частотам рекомбинации в процессе мейоза (оогенез или сперматогенез) подсчитано, что в геноме человека достаточно найти и картировать около 1000 полиморфных маркеров, чтобы уста-

новить надежную сцепленность любого гена с каким-либо полиморфным участком ДНК. Картирование генов с опорой на метод ПДРФ осуществляется с разрешением 10^6 – 10^7 п.н.

Для работы по физическому картированию хромосом и бактериальных геномов применяют редкощепляющие рестриктазы, а их рестрикты анализируют гель-электрофорезом в пульсирующем (PFGE) или инверсионном (FIGE) электрическом поле (см. приложение). Рестриктазы *NotI* и *SfiI*, сайты узнавания которых содержат 8 п.н., широко используются для этих целей. Средний размер фрагментов, образуемых ими, составляет для ДНК *E. coli* 200 и 150 т.п.н., соответственно, а для ДНК человека 100 и 30 т.п.н. Рестриктаза *NruI* (TCGCGA) и *BssHII* (GCGCGC) узнают сайты из 6 п.н., в состав которых входят динуклеотиды CG, редко встречающиеся в ДНК млекопитающих. Поэтому их используют для расщепления этой ДНК. Применяют также комбинированное воздействие на ДНК определенных метилаз и рестриктаз. Например, рестриктаза *DpnI* расщепляет только метилированный сайт GATC. Аденин могут метилировать в обеих нитях метилазы *TaqI* (TCGA) и *ClaI* (ATCGAT). Поэтому после их действия рестриктаза *DpnI* узнает только “восьмерку” TCGATCGA или “десятку” ATCGATCGAT. Очевидно будет использоваться и недавно открытая рестриктаза *SgrAI*, также узнающая “десятку” CAGCCGGTCCG.

Физические карты отдельных хромосом строят последовательными операциями:

- 1) конструируют банк генов данной хромосомы путем расщепления ее ДНК редкощепляющими рестриктазами и клонирования фрагментов с помощью векторов типа YAC, BAC или PAC (см. гл. 7);

- 2) выявляют какие-либо характерные свойства каждого фрагмента ДНК, например, ПДРФ, профиль гибридизационных проб и т. п.;

- 3) получают клонотеки каждого фрагмента ДНК путем клонирования в λ -векторах субфрагментов, образованных частичным его гидролизом мелкощепляющими рестриктазами;

- 4) расставляют субфрагменты в определенном порядке, используя правило, что если два клон имеют некоторые общие характеристики, то они перекрываются;

5) устанавливают порядок исходных (крупноразмерных) фрагментов.

Проанализируем пункты 4 и 5 этой программы. Размер субфрагментов таков, что пункт 4 можно выполнить методом “прогулки по хромосоме” (см. рис. 9.9). В то же время для расстояний, превышающих несколько сотен пар нуклеотидов, этот метод слишком трудоемок и, кроме того, по мере увеличения длины повышается вероятность ошибки в картировании из-за повторов и других причин. Поэтому с целью картирования фрагментов ДНК, образуемых редкощепящими рестриктазами (пункт 5 программы), разработан метод “прыжков по хромосоме” (Collins, Weissman, 1984).

Этот метод фактически является вариантом метода “прогулки по хромосоме”. Для его осуществления с использованием λ -векторов конструируют дополнительно “прыжковую” библиотеку (рис. 9.12,а) и библиотеку клонов-связок (рис. 9.12,б). В первой библиотеке каждый из крупноразмерных рестриктов (в нашем примере *NotI*) представлен клоном, в котором сохранились только его концевые части L и R, разделенные маркером *supF*. Такие клоны существенно облегчают процедуру картирования, поскольку позволяют заменять большие фрагменты их малоразмерными копиями. Второй банк содержит клонированные из геномной ДНК сайты узнавания для редкощепящей рестриктазы (*NotI*) с примыкающими к ним участками ДНК, так что каждый из клонов этого банка представляет собой связку между соседними (n и $n+1$) крупноразмерными фрагментами геномной библиотеки. При конструировании обеих библиотек для селекции применяют ген *supF*, который присоединяют к рестриктам геномной ДНК, а в векторе предусматривают наличие amber-мутаций. В несупрессирующих клетках *E. coli sup^o* развиваются только рекомбинантные фаги, приобретшие ген *supF*. Используя клон-связку как гибридизационный зонд в геномной или “прыжковой” библиотеке, отыскивают очередной клон.

Методы “прогулки” и “прыжков по хромосоме” применяют и для частных задач, например, для картирования изучаемого гена (фрагмента ДНК) относительно сайта (фрагмента ДНК) с известной локализацией.

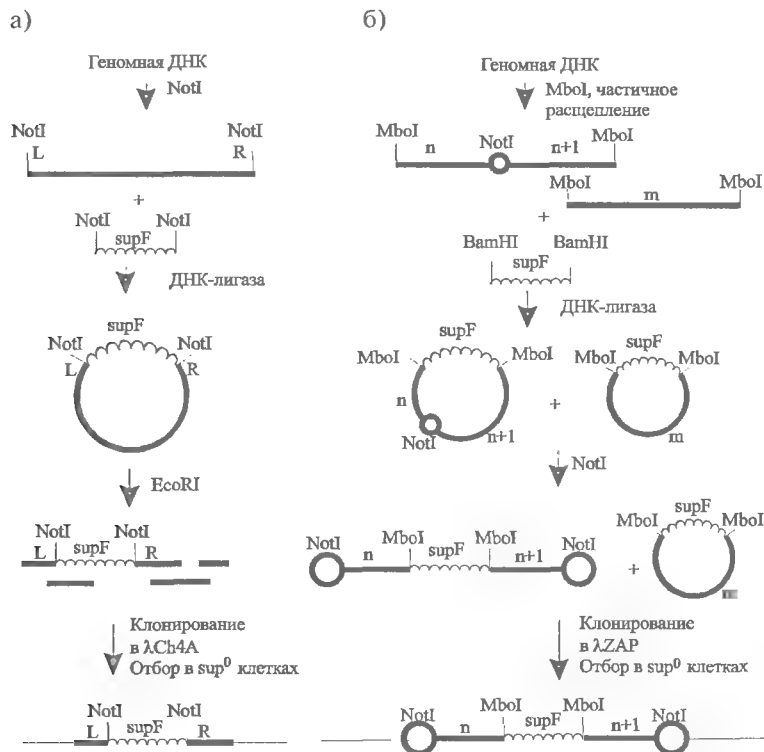


Рис. 9.12. Схема конструирования "прыжковой" библиотеки (а) и библиотеки клонов-связок (б) для физического картирования ДНК методом "прыжков по хромосоме".

L и R — левый и правый концы *NotI*-рестрикта; n и n+1 — соседние участки в хромосоме, разделенные сайтом *NotI*.

Интересный подход был использован для составления физической карты *E. coli* (Kohara *et al.*, 1987). Были определены рестрикционные карты клонированных фрагментов ДНК из геномной библиотеки и установлена с помощью компьютеров их очередность путем выявления сходства в концевых участках этих карт. Здесь было возможно появление ошибок из-за повторяющихся последовательностей. С целью преодоления этого препятствия для 1056 клонов методом частичного перевара (см. рис. 9.8) были построены

карты для восьми рестриктаз. Так удалось точно паспортизировать проанализированные клоны и по совпадению отдельных участков объединить их в 70 контигов, т. е. групп сцепленных и расположенных в известном порядке клонов. Закрытие разрывов между контигами велось направленным поиском недостающих клонов с помощью гибридизационных тестов и проверки их рестрикционным картированием. Хотя для этого пришлось дополнительно проанализировать 2344 клон, семь разрывов закрыть не удалось. Образовавшиеся семь суперконтигов были привязаны к генетической карте *E. coli*. Составление полной энциклопедии было вскоре завершено выделением перекрывающихся космидных клонов (Knott *et al.*, 1989).

Определение первичной структуры ДНК

В середине семидесятых годов были предложены два метода определения нуклеотидной последовательности (секвенирования) небольших фрагментов ДНК — химической модификации оснований (метод Максама-Гилберта; Maxam, Gilbert, 1977) и полимерного копирования (метод Сэнгера; Sanger, Coulson, 1975; Sanger *et al.*, 1977). Первый метод основан на химических реакциях, ведущих непосредственно на анализируемой ДНК. Во втором методе информация о последовательностях нуклеотидов черпается из анализа однокитевых копий анализируемой ДНК. Обоим методам присущи некоторые общие черты.

1. Секвенирование ведут с очищенной (как правило, клонированной) ДНК.

2. В одной реакции секвенируется только одна нить ДНК.

3. Реакции ведут, как минимум, в четырех разных пробирках, причем отсчет нуклеотидов во всех пробирках ведут от одинакового начала.

4. В результате реакции в каждой пробирке образуется набор меченых однокитевых фрагментов ДНК различной длины, причем число вариантов длин равно количеству определенных (в каждой пробирке разных) нуклеотидов в анализируемой ДНК.

5. Разделение фрагментов ДНК по их длинам ведут методом электрофореза в 6–20 %-ном полиакриламидном геле (см. прило-

жение) в денатурирующих условиях (7 М мочеви́на, 70 °С), что сводит к минимуму влияние вторичной структуры фрагментов на их подвижность. Электрофорез проводят одновременно на параллельных дорожках в одном и том же геле, что позволяет различать до 300 фрагментов, отличающихся друг от друга на один нуклеотид. Положение электрофоретических зон фиксируют на рентгеновской пленке.

При секвенировании важно выбрать точки отсчета анализируемых нуклеотидов. В химическом методе для решения этой проблемы в 5'- или 3'-конец анализируемого однострессового фрагмента ДНК вводят радиоактивную метку. При использовании метода полимеразного копирования отсчет нуклеотидов начинают от праймера, инициирующего синтез полинуклеотидной цепи. Оба метода позволяют определить в одном эксперименте последовательности не более чем в 300 нуклеотидов.

Известные методы секвенирования безошибочны. Поэтому при определении новой нуклеотидной последовательности эксперимент следует повторить. Лучше всего это сделать, проанализировав комплементарную цепь ДНК. В случае выявления мутации в уже известной последовательности повтора не требуется.

Химический метод. Метод Максама—Гилберта основан на реакциях, которые специфически модифицируют азотистые основания (табл. 9.2).

Таблица 9.2

Способы модификации специфических оснований и разрыва цепей ДНК

Модификация	Удаление оснований	Разрыв цепи	Специфичность
50–60 %-ная муравьиная кислота	Самопроизвольно	Пиперидин*	A+G
Диметилсульфат, рН 8.0	Пиперидин	То же	G
12–15 М гидразин	То же	"-	C+T
14–17 М гидразин	"-	"-	C
+ 1,5 М NaCl			
1,2 N NaOH, 90° C	"-	"-	A>C

*Используется горячий (90°) 1М пиперидин.

Затем модифицированные основания при последующей обработке отсоединяются от нуклеотидной цепи, в результате чего цепь рвется пиперидином в сахаре, не содержащем основания (рис. 9.13).

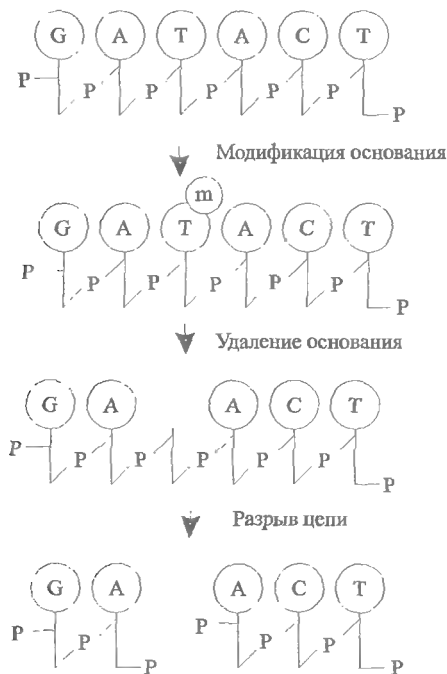


Рис. 9.13. Этапы химических реакций при секвенировании ДНК по методу Максама-Гилберта.

В каждой из реакционных пробирок цепи рвутся около (или преимущественно около) определенного нуклеотида, причем реакция идет в условиях, когда в среднем на одну молекулу приходится один разрыв. Поэтому каждая пробирка в конце реакции содержит два набора цепей разной длины: в одном наборе цепи начинаются с 5'-конца, а в другом — с 3'-конца. На конечном этапе содержимое всех пробирок подвергают (как это описано на стр. 301) электрофорезу в полиакриламидном геле на параллельных дорож-

ках, а положение электрофоретических зон фиксируют на рентгеновской пленке. Оба упомянутых набора содержат информацию о положении одноименных нуклеотидов, но на авторадииграмме выявляется тот, у которого конец помечен. Поскольку отсчет нуклеотидов начинают от этого конца, положение зон на электрофореграмме можно отождествить с положением нуклеотидов в анализируемом фрагменте (рис. 9.14).

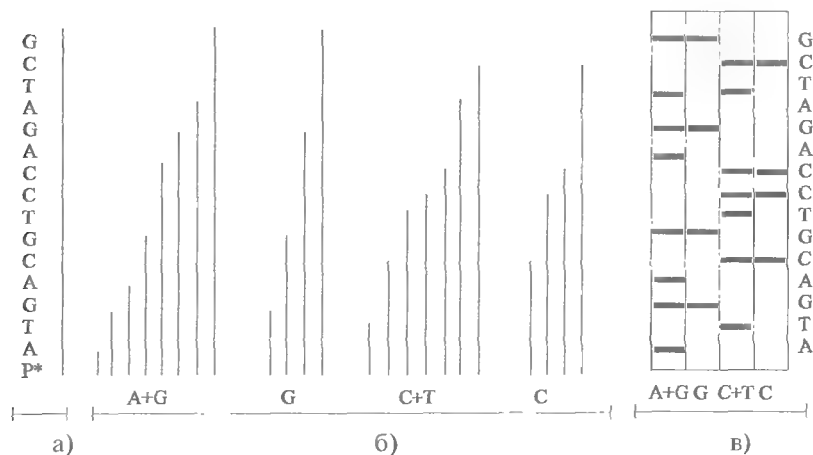


Рис. 9.14. Анализ нуклеотидной последовательности по Максому–Гилберту: *а* — анализируемый рестрикт ДНК; *б* — набор фрагментов при различных условиях модификации ДНК; *в* — электрофореграммы фрагментов, по которым устанавливается последовательность нуклеотидов. A+G, G, C+T, C — концевые нуклеотиды при различных условиях модификации ДНК

Метка обычно вводится в 5'- или в 3'-конец дуплекса, 5'-конец метится последовательным действием щелочной фосфатазы и полинуклеотидкиназы фага Т4 (см. гл. 6). Мечение 3'-конца практически только при выступающем 5'-конце дуплекса. В этом случае ДНК-полимераза I достраивает дуплекс, используя меченые $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$. После введения метки ДНК денатурируется, нити разделяются и секвенируются по отдельности. Меченый дуплекс можно также "разрезать" рестриктазой, рестрикты разделить электро-

форезом и секвенировать каждый в двунитевой форме. Фрагменты ДНК, происходящие из немеченой нити, не проявляются на автордиограмме и не мешают анализировать результаты. При длине дуплекса менее 500 п.н. можно получить его полную последовательность, начав анализ с обоих концов.

Метод полимеразного копирования. Из ряда вариаций метода Сэнгера наиболее практичен способ терминирующих аналогов нуклеотидов (Sanger *et al.*, 1977). Он сводится к следующему. Анализируемые фрагменты клонируют в векторах, сконструированных на базе нитевидных фагов. Как правило, для этой цели используют векторы серии M13mp, pEMBL и Bluescript. Субстратом реакции полимеразного копирования служит (+)-нить вектора, к которой рядом с анализируемым фрагментом присоединен стандартный праймер (см. рис. 7.4,в). Синтез ДНК можно вести с помощью кленовского фрагмента ДНК-полимеразы I, но лучше использовать варианты ДНК-полимеразы фага T7 (секвеназы), которые обладают большей процессивностью, или термостабильную Taq ДНК-полимеразу, позволяющую наращивать цепи при 70°C. В обоих случаях уменьшается возможность ошибок в терминации синтеза, вызванных вторичной структурой анализируемого фрагмента.

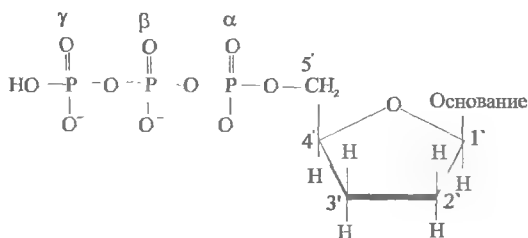


Рис. 9.15. Строение дидезоксинуклеозидтрифосфата

В реакционной смеси кроме четырех стандартных дезокси-нуклеозидтрифосфатов (dNTP) присутствует один из их синтетических аналогов — 2', 3'-дидезоксинуклеозидтрифосфат (ddNTP, рис. 9.15). ДНК-полимеразы могут включать данный аналог в синтезируемую цепь по правилу комплементарности. Однако из-за того, что у аналога 3'-углерод рибозы вместо гидроксильной группы содер-

жит водород, цепь расти дальше не способна. Таким образом, терминация цепи происходит строго на определенном нуклеотиде, заданном экспериментальными условиями. Соотношение концентраций dNTP и ddNTP подбирается с таким расчетом, чтобы в среднем одна молекула аналога включилась (естественно, в разных местах) во все растущие цепи. В результате, если в пробирке содержится ddATP, то к концу реакции в ней оказывается набор всех возможных полинуклеотидов, начинающихся с 5'-концевого нуклеотида праймера и заканчивающихся дезоксиаденозином (точнее, его аналогом ddATP). В матричной цепи он будет указывать на положение тимидина (рис. 9.16). При остановке реакции часть полинуклеотидных цепей терминируется нормальным нуклеотидом случайным образом. Чтобы исключить эту помеху, в конце реакции в реакционную смесь добавляют избыток всех 4 dNTP. Вследствие этого цепи без ddNTP (в нашем примере — без ddATP) достраиваются до конца матрицы и не мешают анализу.

Реакции ведут параллельно в четырех пробирках, в каждую из которых добавляют один из терминирующих аналогов. Синтезированные полинуклеотиды снимают с матрицы формамидом и анализируют электрофорезом в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Положение электрофоретических зон, фиксируемое на автордиограммах, указывает на последовательность нуклеозидмонофосфатных остатков в анализируемом фрагменте ДНК. Мечение синтезируемых фрагментов достигается либо добавлением в среду какого-либо dNTP, содержащего фосфор ^{32}P в α -положении, либо введением ^{32}P в 5'-конец праймеров с помощью полинуклеотидкиназы.

Число зон, прочитываемых на электрофореграмме, зависит от степени их четкости. β -Излучение фосфора ^{32}P достаточно жесткое, что приводит к размытию зон, особенно в начальной части геля. Кроме того, его небольшой период полураспада (14,3 дня) привносит многие технические неудобства, в частности, не позволяет проводить повторную автордиографию образцов. По этой причине в последние годы для секвенирования предпочитают использовать тионуклеозидтрифосфаты, меченные серой ^{35}S (период полураспада 87,4 дня) в α -положении (см. рис. 8.7).

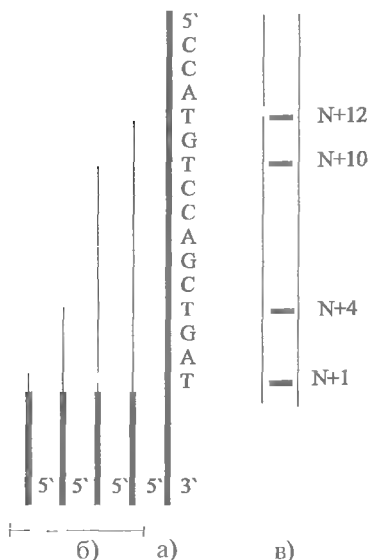


Рис. 9.16. Анализ нуклеотидной последовательности по методу терминирующих аналогов нуклеозидтрифосфатов: *а* — одонитевой фрагмент ДНК (матрица) с анализируемой последовательностью; *б* — олигонуклеотиды, синтезированные на матричной ДНК в присутствии праймера (жирная линия), четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов и ddATP; *в* — электрофореграмма олигонуклеотидов, синтезированных в присутствии ddATP. N — число звеньев в праймере

С введением в практику флуоресцентных меток достигнут серьезный прогресс в автоматизации процесса секвенирования. Наиболее эффективный способ их использования — присоединение к каждому из четырех терминирующих аналогов

специфической метки, отличающейся от других спектром флуоресценции. Такие модифицированные нуклеозидмонофосфаты включаются в цепь ДНК-полимеразой и выполняют сразу две функции — терминируют синтез ДНК и вводят метку в ее 3'-конец. Все это значительно упростило процедуру секвенирования: ферментативную реакцию проводят в одной пробирке и, соответственно, электрофорез продуктов реакции ведут на одной дорожке. Специальный детектор спектра флуоресценции определяет поочередно прямо в геле природу концевых нуклеотидов у разделенных продуктов и передает эту информацию в компьютер, где эта информация накапливается и обрабатывается (см. приложение).

Перспективен для автоматизации метод мультиплексного секвенирования (Church, Kieffer-Higgins, 1988). В этом варианте для каждой из четырех реакций готовится свой праймер. Праймеры состоят из двух частей по 15–20 нуклеотидов каждая. На их 3'-конце находится одинаковая для всех последовательность, идентичная стандартным праймерам для векторов M13mp, а 5'-концевая последовательность специфична для каждого праймера. После реакций секвенирования гель-электрофорез ведут на одной до-

рожке, фрагменты ДНК переносят на гибридизационный фильтр и результат прочитывают, используя специфические зонды к 5'-концам праймеров.

Секвенирование определенного фрагмента ДНК можно проводить и без клонирования в присутствии большого количества посторонней ДНК, если доступен праймер для анализируемого фрагмента. К примеру, для секвенирования генов, мутировавших в результате инсерционного мутагенеза (см. гл. 2), удобно использовать праймеры, комплементарные концам транспозонов (Nag *et al.*, 1988). Для этой цели используют метод полимеразного копирования с применением термоциклеров (см. приложение, раздел “Полимеразная цепная реакция”) и термостабильных ДНК-полимераз (Taq, Vent, Deep Vent и др.; см. гл. 6). Этот метод удобен из-за возможности секвенировать двунитевую ДНК, чему способствуют повторяющиеся акты денатурации анализируемого фрагмента и его гибридизации с праймером и вновь синтезированными фрагментами.

Анализ больших последовательностей. Для установления последовательности нуклеотидов в больших фрагментах ДНК (более 1 т.п.н.) либо в целых геномах вирусов или плазмид требуется предварительная разработка стратегии секвенирования. Она сводится к выбору метода секвенирования, способа фрагментации ДНК и способа восстановления полной последовательности нуклеотидов в анализируемой последовательности.

Существуют две стратегии секвенирования — направленный и случайный (shot-gun) анализ. В обоих подходах большую нуклеотидную последовательность расщепляют на более мелкие фрагменты и секвенируют их. В первом случае очередность фрагментов должна быть известна, а во втором — нет.

В случае направленного анализа вначале составляют физическую (рестрикционную) карту анализируемой области, т. е. определяют взаимное расположение сайтов узнавания различных рестриктаз и примерные расстояния между ними. Затем на основании полученных данных подбирают комбинации рестриктаз для образования таких фрагментов, которые бы имели определенный размер и перекрывали всю исследуемую область. Эти фрагменты секвенируют, после чего восстанавливают полную нуклеотидную последовательность области, пользуясь ее рестрикционной картой.

Данный способ можно применять для областей ДНК, не превышающих по размеру нескольких тысяч пар нуклеотидов.

При больших размерах молекул ДНК возникают технические затруднения, поскольку составление физических карт, выделение и клонирование многих определенных фрагментов является трудоемкой задачей. Поэтому предложены различные методы образования набора делеций, которые начинаются в общей точке и простираются в анализируемую область на разную длину. Это позволяет не проводить ее физическое картирование и секвенировать ее с использованием общего праймера. Наиболее практичен метод с использованием экзонуклеазы III, описанный в гл. 8 (см. рис. 8.11).

При втором подходе вначале анализируемую ДНК дробят случайным образом (ультразвук или ДНКаза I в присутствии ионов Mn^{2+}) до образования фрагментов размером не более 500 п.н., а затем получают из них клонотеку, представляющую всю анализируемую область. После этого из клонотеки наугад берут клоны и секвенируют их (как правило, по Сэнгеру). Данные анализа отдельных фрагментов накапливаются в компьютере (см. приложение) и группируются в контиги — группы из нескольких последовательно соединенных секвенированных участков (Staden, 1986). В процессе работы контиги наращиваются по длине и постепенно объединяются, а число разрывов между ними уменьшается. Эта процедура позволяет достаточно эффективно опреледелить последовательность нуклеотидов в значительной части всего генома (около 80 %), после чего резко возрастает число секвенирований, дающих уже известную информацию. Поэтому далее целенаправленно методом гибридизации отыскивают клоны, содержащие еще не проанализированные последовательности. Подход основан на том факте, что последовательности нуклеотидов в блоках перекрываются. Это дает возможность использовать в качестве зондов для поиска отсутствующих клонов те клоны, на которых прервался анализ последовательности нуклеотидов. Восстановление полной нуклеотидной последовательности и ее анализ осуществляют с применением ЭВМ.

Данный способ незаменим для секвенирования областей ДНК, размер которых превышает 10 т.п.н. В этих случаях получают субклоны фрагментов ДНК размером 3–5 т.п.н., каждый из которых секвенируют по отдельности. Именно так впервые был секвенирован целый геном — ДНК фага λ , содержащий 48502 п.н.

(Sanger *et al.*, 1982), на что ушло более года работы целой лаборатории. На конец 1998 года известна нуклеотидная последовательность у 317 вирусов животных и растений и 43 бактериофагов.

Секвенирование клеточных геномов. Разработка автоматических секвенаторов существенно ускорила процесс анализа последовательностей и позволила приступить к секвенированию клеточных геномов, для которых предварительно составляют физические карты. Как правило, секвенируют по отдельности фрагменты геномной ДНК размером 40–200 т.п.н., клонированные с помощью космид, λ -векторов, а также векторов типа YAC, BAC или PAC (см. с. 271). Для этого ДНК каждой вставки дробят случайным образом и субклоны секвенируют наугад. Далее составляют контиги, объединение которых завершает анализ фрагмента. Последовательная “привязка” фрагментов к физической карте генома позволяет контролировать процесс его секвенирования. Уже известна полная нуклеотидная последовательность нескольких клеточных геномов:

у архей — *Archaeoglobus fulgidus* (2,3 млн.п.н., Klenk *et al.*, 1997), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (1,8 млн.п.н., Smith *et al.*, 1997), *Methanococcus jannaschii* (1,7 млн.п.н., Bult *et al.*, 1996), *Pyrobaculum aerophilum* (1,8 млн.п.н., не опубликовано), *Pyrococcus furiosus* (2,1 млн.п.н., не опубликовано), *Pyrococcus horikoshii* (1,7 млн.п.н., Kawarabayasi *et al.*, 1998); *Thermotoga maritima* (1,8 млн.п.н., не опубликовано);

у бактерий — *Aquifex aeolicus* (1,5 млн.п.н., Deckert *et al.*, 1998), *B. subtilis* (4,2 млн.п.н., GenBank, 1997), *B. burgdorferi* (1,3 млн.п.н., Fraser *et al.*, 1997), *Chlamydia trachomatis* (1,0 млн.п.н., Stephens *et al.*, 1998), *Deinococcus radiodurans* (3 млн.п.н., не опубликовано), *E. coli* (4,6 млн.п.н., Blattner *et al.*, 1997), *Haemophilus influenzae* (1,8 млн.п.н., Fleischmann *et al.*, 1995), *Helicobacter pylori* (1,7 млн.п.н., Tomb *et al.*, 1997), *Mycobacterium tuberculosis* (4,4 млн.п.н., Cole *et al.*, 1998), *Mycoplasma genitalium* (0,6 млн.п.н., Fraser *et al.*, 1995), *Mycoplasma pneumoniae* (0,8 млн.п.н., Himmelreich *et al.*, 1996), *Rickettsia prowazekii* (1,1 млн.п.н., Andersson *et al.*, 1998), *Synechocystis* PCC6803 (3,6 млн.п.н., Kaneko *et al.*, 1996) и *Treponema pallidum* (1,1 млн.п.н., Fraser *et al.*, 1998);

у эукариот — *S. cerevisiae* (12,0 млн.п.н., Goffeau *et al.*, 1996), *Caenorhabditis elegans* (100 млн.п.н., Science, 1998).

Следует отметить важность секвенирования генома *M. tuberculosis*, поскольку туберкулез во всем мире принял эпидемический характер из-за растущего числа антибиотико-устойчивых штаммов. Каждый третий человек инфицирован этими бактериями, и у каждого из них есть 10%-ая вероятность того, что болезнь перейдет в клиническую форму. В 1997 году от этой болезни умерло около 2,9 миллиона человек. Есть надежда, что проведенный анализ позволит разработать более эффективные средства против этого микроба.

О масштабе работы можно судить на примере секвенирования ДНК *M. jannaschii*. Эти анаэробные археобактерии выделены с глубины 2600 м, где давление достигает 200 атм, а температура 90 °C. ДНК размером 1660 т.п.н. содержит лишь 31,4 % GC-пар, в ней было выявлено 1738 открытых рамок считывания. Секвенирование проводили методом случайного анализа вставок (средний размер 2,5 т.п.н.), клонированных в плазмидных векторах. В одной реакции определяли в среднем последовательность из 481 нуклеотида, а всего было сделано 36178 анализов. Континги формировали с помощью банка генов, полученного с использованием фага λ .

Еще более впечатляет работа по секвенированию генома дрожжей, в которой участвовало около 600 ученых. Последовательность из 12 млн.п.н. была установлена за 5 лет, включая время на конструирование двух независимых космидных библиотек (энциклопедий) дрожжевых генов. Компьютерный анализ позволил установить функции почти половины из 6000 выявленных дрожжевых белков, причем большинство из них были в той или иной степени гомологичны человеческим белкам.

Наконец, подчеркнем значимость завершения 15-летней работы по секвенированию первого животного генома — нематоды *C. elegans*, результатам которой посвящен специальный выпуск журнала Science (Science, 1998). Этот круглый червь длиной около 1 мм состоит из менее, чем тысячи клеток, но его биология основана на общих для животных принципах. Он также развивается от зародыша до взрослого организма, имеет кишечный тракт, нервы, мышцы, кожу. Его геном состоит из 100 млн.п.н., причем около 40 % его генов сходны с генами млекопитающих. Поэтому сравнение его генома с человеческим позволит идентифицировать родственные гены, определить их функции у нематоды и, таким образом, сделать выводы о функциях

соответствующих человеческих генов. По этим данным можно понять причины многих наследственных заболеваний.

Но самая грандиозная задача — программа “Геном человека”, которая была начата в 1987 году в США и к которой вскоре присоединились многие страны, в том числе СССР (Россия). Цель программы — секвенировать все 24 человеческие хромосомы, 22 аутосомы и 2 половые — X и Y. Гаплоидный набор хромосом содержит около 3×10^9 п.н., в нем имеется приблизительно 60–80 тысяч генов. К концу 1998 года секвенировано 211 млн. п.н., т. е. около 7 % всего генома, картировано 30 тысяч генов (Deloukas *et al.*, 1998). Более половины данных по секвенированию представлены контигами размером более 100 т.п.н. Здесь контигом является клонированный и секвенированный фрагмент ДНК.

Важной этапной задачей программы являлось построение физической карты каждой хромосомы, т. е. последовательного расположения на ней клонированных фрагментов (см. с. 293). Клоны с такими фрагментами служат основным материалом для дальнейших операций по секвенированию и для процедур выделения каких-либо конкретных генов. С учетом среднего размера клонированных фрагментов было необходимо установить маркеры через каждые 100 т.п.н. на всех хромосомах (всего около 30 тысяч маркеров). Теперь человеческие хромосомы физически картированы. Получены PAC-, BAC- и YAC-библиотеки генома, в которых суммарный размер вставок составляет десятки эквивалентов гаплоидных геномов.

Закончить полное секвенирование генома человека намечено в 2003 году, причем 90 % генома будет проанализировано в 2001 году. Эти планы опираются на стремительный прогресс в технике и стоимости секвенирования. Если в 1990 г. эта стоимость составляла \$10 за один нуклеотидный остаток, то в 1998 г. она равнялась уже \$0,5. Гель-электрофорез становится возможным проводить в капиллярах, что ускоряет и повышает точность анализа. Развиваются и “негелевые” методы — масс-спектрометрия и гибридизация на кремниевых “ДНК-чипах”, на поверхности которых нанесены десятки тысяч коротких детерминированных фрагментов ДНК.

Важной составляющей программы “Геном человека” является сравнительная геномика, т. е. сравнение различных геномов. Кроме законченного анализа ДНК нематоды с этой целью секвениру-

ются и другие модельные геномы. У *Arabidopsis thaliana* секвенировано 8,8 из 100 млн.п.н., у *Caenorhabditis briggsae* — 6,1 из 3,000 млн.п.н., у *Drosophila melanogaster* — 16,9 из 165 млн.п.н., у *Schizosaccharomyces pombe* — 5,7 из 14 млн.п.н. Анализ генома дрозофилы будет завершен в 2002 году, генома мыши — в 2008 году.

Секвенирование генома человека, без сомнения, будет способствовать прогрессу в выявлении дефектных генов и внедрению новых методов диагностики и лечения генетических заболеваний. Станет возможным выявлять индивидуальные предрасположения к различным заболеваниям и давать рекомендации как их избежать.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОВТОРЕНИЯ И ОБСУЖДЕНИЯ

9.1. При синтезе второй нити кДНК методом ник-трансляции (см. рис. 9.3,а) не заменяются несколько нуклеотидов на 5'-конце мРНК. Почему?

9.2. Число зон, прочитываемых на электрофореграмме, зависит от степени их четкости. β -Излучение фосфора ^{32}P достаточно жесткое, что приводит к размытию зон, особенно в начальной части геля. Почему?

9.3. Чем определяется выбор вектора для получения геномного банка?

9.4. Составьте план эксперимента по получению банка генов дрожжей в векторе pAd10sacBII.

9.5. Составьте план эксперимента по получению банка кДНК мыши. Какой вектор вы предпочтете и почему?

9.6. У вас имеется человеческий белок с интересными свойствами. Как найти ген, кодирующий этот белок?

9.7. Скрининг банка генов человека позволил вам отыскать ген в задаче 9.6. Как определить, на какой хромосоме он находится?

9.8. Составьте план эксперимента по физическому картированию искомого гена, если известно, на какой хромосоме он находится.

9.9. В банке генов, полученном с помощью вектора λ ZAP, найден нужный ген. Составьте план эксперимента по его секвенированию.

9.10. Опишите, из каких этапов складывается работа по секвенированию клеточных геномов.

ЧАСТЬ III

ЭКСПРЕССИЯ ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ

Решение проблемы клонирования чужеродных генов позволило детально изучать их структуру. Для исследования же строения и функций кодируемых ими белков, а также для использования этих белков в прикладных целях необходимо добиваться экспрессии чужеродных генов.

В настоящее время трудно представить, как можно было бы изучать молекулярную биологию высших эукариот без методов генетической инженерии, особенно не имея возможности вмешиваться в экспрессию определенных генов в определенных клетках и тканях организма. Замена функционального аллеля гена на полностью дефектный (нуль-аллель) и наблюдение фенотипического эффекта — самый прямой путь установления его функции. Были выяснены принципы, на которых основана тканеспецифичность экспрессии генов, в общих чертах стали ясны молекулярные механизмы развития индивидуальных особей.

Синтез белковых продуктов является одной из важнейших целей генетической инженерии. Производство ферментов, мембранных белков, рецепторов, нейропептидов для использования их в разных целях, включая лечебные, а также структурных вирусных белков как вакцинирующих средств — все это зависит от доступности эффективных экспрессионных векторов. Важно иметь широкий выбор экспрессирующих систем, поскольку каждой из них присущи свои преимущества и недостатки. Выбор системы зависит от природы и количества получаемого продукта, а также от его желаемых свойств (биологическая активность, растворимость, секретирруемость, неаллергенность и т. п.).

Как известно, экспрессия генов осуществляется путем их транскрипции и трансляции. Эффективность транскрипции зависит, прежде всего, от степени сродства РНК-полимеразы к промотору, а эффективность трансляции — от стабильности мРНК и ее способности связываться с рибосомами. Следовательно, системы транскрипции и трансляции реципиентных клеток должны “узнавать” последовательности нуклеотидов в регуляторных сайтах клонируемых генов. Это достигается путем присоединения чужеродного гена к промотору, сайту связывания рибосом и терминатору транскрипции, специфичным для тех клеток, в которых ген клонируется. Готовый набор этих элементов называют экспрессионной кассетой. Встраивание в кассету чужеродного гена приводит обычно к его экспрессии.

Однако не всегда при успешной экспрессии чужеродного гена можно получить функционально активный продукт. Дело в том, что многие эукариотические белки активируются только после их модификации (например, после протеолиза, гликозилирования, фосфорилирования и т. п.), происходящей в результате действия специфических клеточных ферментов. Но чужеродные белки могут неправильно модифицироваться или не модифицироваться вообще. Это ограничивает выбор реципиентных клеток, когда нужно получить активные модифицированные белки. В таких случаях для клонирования генов приходится использовать клетки организмов, родственных тем, откуда были взяты гены. С этой целью разрабатываются системы клонирования и экспрессии генов в различных семействах бактерий и низших грибов, в растительных и животных клетках (“Транскрипция и трансляция. Методы”, 1987; “Maximizing gene expression”, 1986).

Глава 10

БАКТЕРИИ

Проблемы, возникающие при экспрессии чужеродных генов в бактериях, наиболее полно исследованы на клетках *E. coli*. В них переносили гены из клеток, родственных с ними в различной степени. Как оказалось, при внутрисемейственном переносе генов их экспрессия осуществляется сравнительно легко, поскольку в данном случае нет разницы между системами транскрипции и трансляции донорных и реципиентных клеток. Однако уже при межсемейственном переносе из-за более существенной разницы между этими системами чужеродные гены экспрессируются неэффективно. Системы транскрипции и трансляции про- и эукариот отличаются принципиально (см. табл. 1.1). В связи с этим экспрессия эукариотических генов, перенесенных в бактерии вместе с собственными регуляторными элементами, происходит лишь из-за случайных благоприятных совпадений. Поэтому необходимо заменять эукариотические регуляторные элементы на бактериальные, для чего было предложено несколько способов. С их применением была в основном решена проблема экспрессии чужеродных генов в бактериях.

К настоящему времени не сложилось четкого представления о механизмах влияния локальной структуры ДНК на эффективность транскрипции генов. Не выяснены до конца также причины нестабильности векторов и рекДНК в реципиентных клетках. Нестабилен в бактериях и сам чужеродный белок. Кроме того, установлено, что состав кодонов эукариотических генов не оптимален для их экспрессии в бактериальных клетках. В связи с этим приходится принимать меры по оптимизации экспрессии чужеродных генов, т. е. подбирать подходящие промоторы, операторы, терминаторы транскрипции, сайты связывания рибосом, фи-

зиологические условия и т. д. Удачно налаженная система экспрессии приводит к образованию суперпродуцентов, в которых выход чужеродного продукта может достигать 10–40 % от суммарного белка. Важнейшие задачи при культивировании суперпродуцентов — поддержание их стабильности и обеспечение секции синтезируемых ими продуктов.

Проблемы экспрессии чужДНК в бактериальных клетках

Экспрессия генов является сложным многоэтапным процессом, зависящим от многих факторов, которые влияют на этот процесс на разных уровнях — на уровне ДНК, мРНК или белка.

Уровень ДНК. На этом уровне эффективность экспрессии зависит: 1) от силы промотора; 2) наличия терминатора транскрипции; 3) отсутствия внутригенных терминаторов транскрипции; 4) числа копий гена; 5) суперспирализации рекДНК; 6) от расположения чужеродного гена по ходу движения репликативной вилки. Рассмотрим по очереди эти факторы.

1. Силу промоторов определяют по тому, с какой частотой они способны инициировать акты транскрипции. У сильнейших промоторов (например, в генах рРНК) это происходит каждые 5–10 с, у слабейших (например, промотор гена *lacI*) — один раз за генерацию. Промотор относят к сильным, если контролируемый им ген обеспечивает синтез белка, составляющий не менее 10 % от суммарного белка. Сила промотора зависит от двух параметров — константы связывания РНК-полимеразы с промотором (этот процесс приводит к образованию закрытого комплекса) и от скорости раскрытия этого комплекса, т. е. скорости разрыва в нем водородных связей между комплементарными нитями ДНК (McClure *et al.*, 1983). Чем выше эти параметры, тем промотор сильнее. У сильных промоторов структура боксов –10 и –35 оказалась слегка отличной от стандартной. Бокс –10 представлен последовательностями PuTATATPu или TATAATPu, а бокс –35 — последовательностями (G/C)TT(G/C)A(G/C)A(A/T)TT(G/T) или TT(G/C)TTGACA(A/C), причем перед этим боксом обычно находится АТ-богатый участок (Артемьев *и др.*, 1983). Эффективность транскрипции повышается также, если в зоне основного промо-

тора имеются дополнительные сайты связывания РНК-полимеразы. Подобные множественные промоторы имеются, например, у *lac*-оперона (Reznikoff *et al.*, 1985).

В табл. 10.1 перечислены некоторые промоторы, используемые для экспрессии чужеродных генов в клетках *E. coli*, и указаны способы регулирования их активности. Из них наиболее часто применяются промоторы λpL , *lacUV5* и *trp*. Их выбор был обусловлен частично историческими причинами, а также их силой и способностью к индукции. Помимо этого оказалось важным, насколько промоторы неактивны в репрессированном состоянии. Дело в том, что некоторые белки (например, инсулин) токсичны для бактериальных клеток, поэтому клонирование соответствующих генов с целью их дальнейшей экспрессии невозможно при использовании конститутивных или слабо регулируемых промоторов. Для практического применения также важно, насколько экономичен способ индукции.

Таблица 10.1

Промоторы, используемые в векторах для клонирования в *E. coli*

Промотор	Выключен	Включен
λpL^*	30 °C	> 37 °C
λpR^*	30 °C	> 37 °C
<i>lacUV5</i>		IPTG
<i>trp</i>	Триптофан в среде	Индолуксусная кислота
<i>tac, trc**</i>		IPTG
<i>phoA</i>	Избыток фосфата	Недостаток фосфата
<i>tet</i>		Тетрациклин

* Под контролем термочувствительного репрессора $\lambda CI857$.

** Рекомбинатные промоторы: -10 от *placUV5*, -35 от *p_{trp}*; отличаются одним нуклеотидом между боксами.

В большинстве генно-инженерных конструкций промотор λpL регулируется термочувствительным репрессором *CI857*. Для полной репрессии гена, находящегося под контролем этого промотора, при 28 °C достаточно одной копии гена λcI , даже если

клонлируемый ген присутствует во многих копиях. Эффективным и достаточно дешевым способом индукции является нагрев культуры до 42 °С. Однако приходится учитывать, что при этом индуцируется синтез белков теплового шока, один из которых, протеаза Lon, расщепляет чужеродные белки (см. далее). Этой неприятности можно избежать, используя мутант по гену *rpoH*, который контролирует транскрипцию гена *lon*. Более радикально эту проблему предлагается решать с помощью промотора, индуцируемого добавлением поваренной соли (Bhandari, Gowrishankar, 1997).

О достаточно сложной системе регуляции транскрипции оперона *trp* говорилось в гл. 1. Аттенюатор (см. рис. 1.5) вносит лишь небольшой вклад в репрессию оперона, поэтому в экспрессионных векторах промотор *trp* содержит сайт RBS лидерного пептида, а сама лидерная часть оперона отсутствует. Регуляция генов в подобных конструкциях происходит нормально в присутствии одной копии гена *trpR*.

Мутантный промотор *lacUV5* сильнее промотора дикого типа и гораздо менее чувствителен к катаболитной репрессии глюкозой. Это важно в прикладных целях, поскольку глюкоза — самый дешевый источник энергии при ферментации. На базе этого промотора сконструированы промоторы *tac* и *trc*, в которых область –35 взята от промотора *trp*. Искусственные промоторы оказались в одиннадцать раз сильнее промотора *lacUV5* и в три раза сильнее промотора *trp*. Если промоторы *lacUV5* и *trp* находятся в мультикопийных векторах, для полной репрессии клонируемых генов необходимо использовать мутантный аллель гена *lacI*—*lacI^c*, продуцирующий в десять раз больше Lac-репрессора.

2. Наличие терминатора транскрипции в конце чужеродного гена — фактор скорее желательный, чем обязательный. Излишняя длина мРНК может способствовать образованию такой вторичной структуры, которая будет препятствовать ее успешной трансляции. Волна транскрипции чужеродного гена не должна также захватывать локусы вектора, отвечающие за его стабильность.

3. Присутствие в оперонах слабых внутригенных терминаторов транскрипции способствует поддержа-

нию в клетке необходимого числа транскриптов. При конструировании продуцентов этот фактор может стать лимитирующим для получения нужного уровня синтеза белка.

4. Число плазмидных копий у *E. coli* может варьировать от 1 до 2000 на клетку. Однако количество белка, синтезируемого под контролем плазмиды, увеличивается линейно с повышением числа копий лишь до нескольких десятков или сотен молекул на клетку. Оптимальное число копий вектора в клетке определяется главным образом природой синтезируемого белка и особенностями используемого промотора. Кроме того, необходимо учитывать, что повышенное число копий гена и в связи с этим максимально возможный синтез чужеродного белка полезны только на конечной стадии культивирования продуцента, поскольку на ранних этапах и то, и другое серьезно увеличивает время культивирования и снижает выход продукта. Поэтому желательно предусмотреть в экспрессионном векторе возможность контроля копийности.

В случае токсичных для клетки синтезируемых продуктов удобно использовать термочувствительные *run-away* мутации (см. гл. 3), которые при 42 °C увеличивают число копий плазмиды до 2000 и вызывают гибель клеток. Такие гены помещают под промотор λ pL, регулируемый термочувствительным репрессором C1857, который при 28 °C надежно блокирует, а при 42 °C индуцирует экспрессию гена. В случае нетоксичных продуктов оптимальное число копий плазмиды определяется выбранным промотором. Например, в векторе pBR322 при обычном числе его копий (20–60) хороший выход продукта обеспечивают промоторы λ pL, *lacUV5* и *trp*. В то же время применение его копийных мутантов (до 300 копий) приводит к повышению выхода продукта только при использовании промотора *lacUV5*, поскольку при этом экспрессия гена не подавляется интенсивной репликацией.

Повышение числа копий вектора приводит, конечно, к увеличению выхода и плазмидо-специфических белков, некоторые из которых при высоких концентрациях могут дестабилизировать плазмиды. К таким относится, например, продукт гена *Tc^R*.

5. Эффект увеличения уровня транскрипции генов в суперспирализованной ДНК по сравнению с релаксированной отмечался во многих случаях (Gellert, 1981). По-видимому, это связано с дополнительным энергетическим вкладом суперспирализации в открытие комплекса РНК-полимераза: промотор.

6. Расположение чужеродного гена по ходу движения репликативной вилки позволяет избегать негативных последствий столкновения волн транскрипции и репликации.

Уровень РНК. На этом уровне эффективность экспрессии зависит: 1) от структуры сайта связывания рибосом (RBS); 2) стабильности транскрипта; 3) наличия в мРНК оптимальных кодонов.

1. Эффективность трансляции мРНК прежде всего зависит от структуры RBS. Как уже отмечалось в гл. 1, этот сайт включает в себя SD-последовательность (как минимум любые подряд четыре нуклеотида из последовательности AGGAGG) и иницирующий кодон (AUG гораздо более эффективен, чем GUG или UUG); его типичное строение — AGGAN₆₋₉AUG. Промежуток между SD и AUG насыщен нуклеотидами А или U, причем в положении -3 от иницирующего кодона преобладает А (Stormo, 1986). Некоторые гены обладают дополнительной к SD последовательностью, которая играет роль трансляционного энхансера. Так, в лидерной части мРНК гена *l0* фага T7 энхансером является 9-звенный сегмент 5'UUAACUUUA3', предположительно взаимодействующий с участком 458-466 16S рРНК *E. coli* (Olins, Rangwala, 1989). Его внедрение перед геном *lacZ* позволило увеличить синтез β-галактозидазы более чем на порядок. Реальное строение RBS индивидуально для каждого гена, существенно отсутствует в лидерной части мРНК шпилечных структур, затрудняющих посадку рибосом. Поэтому часто в RBS входит и несколько начальных кодонов гена. Статистически значимо, что вторым кодоном является GCU или AAA, а четвертый и пятый кодоны содержат последовательность UUAA (Stormo, 1986). Важно также и расстояние между 5'-концом мРНК и SD-последовательностью, которое не должно быть менее 15 нуклеотидных остатков.

Приведенные данные касались клеток *E. coli*. Как выяснилось, сходный механизм инициации трансляции используют и другие бактерии, включая грамположительные клетки. В частности, SD-последовательности у *B. subtilis* и *E. coli* очень близки, но бациллярные более специфичны. Это объясняет, почему рибосомы *E. coli* транслируют бациллярные мРНК, а обратный процесс не происходит.

2. Проблема стабилизации транскрипта вызвана тем, что нестабильность мРНК у прокариот — это эволюционно выработанный механизм их быстрой адаптации к изменяющимся условиям. Их инактивация, измеренная по потере массы или функции, происходит по экспоненциальной кинетике. Каждая мРНК характеризуется собственным временем полураспада, в клетках *E. coli* эта величина лежит в пределах от 30 с до 8 мин при 37 °С. Рибосомы защищают мРНК от деградации, поэтому наиболее частой мишенью для эндо- и экзонуклеаз являются нетранслируемые 5'-концы транскриптов (свободные транскрипты расщепляются экзонуклеазами и с 3'-конца). Именно от особенности их строения (расстояние от 5'-конца до SD-последовательности, наличие шпилек, частота посадки рибосом и т. п.) зависит главным образом скорость их распада. Однако какой-либо консервативной последовательности здесь не обнаружено. Есть только один пример успешной “пересадки” лидерной части стабильного транскрипта. Стабильность транскрипта гена 32 фага T4 обеспечивается благодаря специфическому сайту перед иницирующим кодоном и его защите фаговым белком. Это свойство удалось придать в генно-инженерных конструкциях некоторым бактериальным мРНК, но эффект наблюдался только в присутствии указанного белка. Поэтому он не нашел широкого применения.

3. Напомним, что большинство аминокислот кодируются более чем одним кодоном и что разные виды клеток имеют собственный набор предпочтительно используемых (оптимальных) кодонов, который коррелирует с количеством содержащихся в клетке изоакцепторных тРНК (см. табл. 5.1). Задержка рибосомы на каком-либо редко используемом кодоне из-за нехватки тРНК приводит к включению ошибочной аминокислоты, сдвигу рамки считывания или остановке трансляции.

Правило оптимальности кодонов распространяется и на терминирующие триплеты: в активно экспрессирующихся генах предпочтительно используется кодон UAA.

Возможность влиять на эффективность экспрессии генов путем выбора оптимальных кодонов возникает в случае, когда планируется химический синтез гена или его части. Однако простое следование правилу оптимальности далеко не всегда дает желаемый результат, поскольку скорость трансляции мРНК и ее стабильность определяются всем ее эволюционно выработанным контекстом. Во-первых, присутствие в мРНК повторов и шпилек должно быть функционально оправдано. Во-вторых, следует учитывать, что на эффективность трансляции влияют также и окружающие кодон нуклеотиды. Так, у *E. coli* лизин предпочтительно кодируется кодоном AAA, если за ним следует G, или кодоном AAG, если за ним следует C или A. Из двух односмысловых кодонов NNA или NNG, предшествующих кодону AAA, чаще встречается NNG. У эукариот крайне редко встречается динуклеотид CG, а у прокариот ограниченно используется динуклеотид TA. Подобные ограничения предотвращают, возможно, нежелательные взаимодействия соседних тРНК в рибосоме, приводящие к сдвигу рамки считывания. В кодирующей части прокариотических генов почти не попадают SD-последовательности GAGG и GGAG, по-видимому, для того, чтобы избежать внутригенной инициации трансляции. В третьих, замечено, что у генов, кодирующих полифункциональные белки, неоптимальные кодоны часто встречаются в спейсерных участках между областями, кодирующими разные домены белка. Задержка трансляции в таких участках, по-видимому, дает возможность сформироваться необходимой пространственной структуре домена. Отметим, наконец, в-четвертых, что из синонимических кодонов в генах реже встречаются те, которые содержат 100 % G, C, A, U, а также GC или AU. Цель этого ограничения — поддерживать силу взаимодействия кодон-антикодон на приблизительно одинаковом для всех кодонов уровне, что позволяет оптимизировать скорость трансляции (Grosjean, Fiers, 1982).

Из сказанного ясно, что эффект замены синонимических кодонов непредсказуем. Практические рекомендации при пла-

нировании синтеза гена сводятся к следующему: 1) составляется последовательность из оптимальных кодонов; 2) с учетом структуры прилегающего участка вектора эта последовательность модифицируется так, чтобы она соответствовала требуемому консенсусу около иницирующего кодона и одновременно препятствовала образованию шпилек в этой области мРНК; 3) в последовательность вносятся изменения, которые учитывают предпочтительность нуклеотидов, следующих за 3'-концом кодонов (см. табл. 5.1), но не изменяют аминокислотный текст; 4) проводится проверка планируемой мРНК на наличие в кодирующей области потенциальных SD-сайтов и вторичных структур и по возможности осуществляется заключительная модификация, устраняющая эти особенности.

Уровень белка. На этом уровне эффективность экспрессии зависит от 1) стабильности полипептида и 2) его внутриклеточной агрегации. В практическом плане важны также 3) возможность правильной модификации чужеродного белка (включая его процессинг) и 4) его способность к секреции.

1. Стабильность полипептидов в клетках зависит от протеаз, играющих важную регуляторную роль. Они осуществляют процессинг белков при их секреции, превращают пре-белки в белки, отщепляют N-концевой формилметионин и т. д. Кроме того они гидролизуют нефункциональные или денатурированные полипептиды, образующиеся в результате нонсенс-мутаций, делеций, неудачной постсинтетической модификации или процессинга, подстановки аналогов природных аминокислот или даже просто других аминокислот. Эта участь постигает и избыточные количества функционально активных субъединиц мультимерных белковых комплексов, а также многие чужеродные белки — продукты экспрессии клонированных генов, что заставляет отдельно решать проблему стабильности белков.

Механизм избирательного протеолиза белков в деталях не выяснен. В *E. coli* появление аберрантных полипептидов вызывает индукцию белков теплового шока, включая АТР-зависимую сериновую протеазу (эндопептидазу) Lon. АТФазная активность этой протеазы индуцируется только в присутствии измененных белков, что свидетельствует о ее способности распознавать

их. Каким образом она “чувствует” конформационные изменения в разнообразных белках, пока неизвестно. Выявив подобные изменения в белках, она расщепляет их до мелких фрагментов, а дальнейшее расщепление ведут другие эндо- и экзопептидазы.

Наиболее практичный способ стабилизации чужеродных белков основан на наблюдении, что короткие полипептиды менее стабильны, чем длинные. Чужеродный белок удлиняют путем его слияния с белком, который кодируется векторным геном (см. ниже). Удлинения полипептида можно достичь с помощью олигомеризации полипептида. Так, четыре гена проинсулина были соединены олигонуклеотидами, в которых была закодирована мишень для разрезания олигопроинсулина бромцианом (Shen, 1984). Проинсулин, полученный после разрезания, был биологически активным. Время его полураспада в клетках *E. coli* равно 2 мин, а его тетрамера — 120 мин. Использование в качестве реципиентов клеток с мутациями в генах *lon* и *hptR* также позволяет увеличивать время жизни чужеродных белков. Например, время полураспада ростового фактора соматомедина-С в клетках *E. coli* HB101 равно 2—5 мин, а в клетках *lon⁻ hptR⁻* оно превышает 60 мин, что одновременно сопровождается повышением внутриклеточной концентрации фактора в четыре раза (Buell *et al.*, 1985).

2. В системе *in vitro* денатурированные белки взаимодействуют друг с другом гидрофобными участками, агрегируют и выпадают в осадок. По-видимому, сходный процесс часто происходит и в клетках, когда они синтезируют большие количества aberrантных полипептидов. Такие полипептиды, а также нормальные по аминокислотной последовательности рекомбинантные белки, могут образовывать нерастворимые агрегаты. Внутриклеточная агрегация белков является одним из способов их сохранения в клетке.

Феномен внутриклеточной агрегации рекомбинантных белков еще плохо понят: по структуре генно-инженерного белка нельзя предсказать, как он себя поведет. Например, более 90 % фактора некроза опухолей человека с высоким уровнем экспрессии (20 % от общего белка) в клетках *E. coli* HB101 находится в растворимой форме. В то же время синтезированный с того же вектора и до того же уровня человеческий лейкоцитар-

ный α -2-интерферон находится в тех же клетках в виде нерастворимых агрегатов. В этом случае после лизиса клеток лишь около 1 % интерферона экстрагируется в водную фазу, а его основная часть экстрагируется только детергентами (например, додецилсульфатом натрия) или хаотропными веществами, сохраняя при этом свою активность. Непредсказуема и кинетика накопления белков в клетке в процессе их культивирования. Количество α -2-интерферона в клетках остается постоянным вплоть до перехода их в стационарную фазу роста. Затем содержание интерферона в клетке начинает увеличиваться и через 20 часов превосходит прежний уровень в 30–40 раз, в то время как количество β -лактамазы, кодируемой тем же вектором, не изменяется (рис. 10.1; Panayotatos *et al.*, 1983).

ОП 590

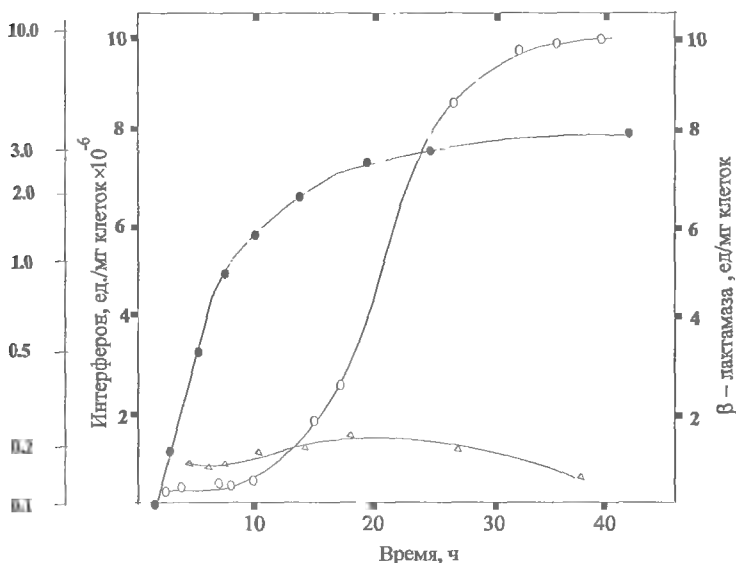


Рис. 10.1. Кинетика синтеза α -2 интерферона и β -лактамазы в клетках HB101.

Культуры аэрировались при 37 °С в L-среде. ● — оптическая плотность (ОП) культуры; ○ — активность интерферона; △ — активность β -лактамазы

Для практических целей явление внутриклеточной агрегации рекомбинантных белков носит двойственный характер. С одной стороны, оно полезно, ибо позволяет селективно отделять их от растворимых белков. С другой стороны, почти каждый из таких агрегатов требует разработки индивидуального метода растворения (подбора солибилизирующего агента, условий ренатурации и т.д.). Такие методы обычно являются дорогостоящими.

3. Важность правильной модификации белков для их функциональной активности в эукариотах отмечалась выше. Это явление менее выражено в бактериях, а имеющиеся у них для этой цели собственные ферменты не узнают или модифицируют неправильно чужеродные белки. Поэтому, если получаемый в бактериях эукариотический белок необходим в активной форме, то клонируют ген, в котором сохранена только требуемая для этого нуклеотидная последовательность. В случае же дальнейшего использования белка в родственных для него клетках клонируемый ген может содержать информацию о белке-предшественнике в надежде на то, что при его последующем использовании он будет правильно модифицирован *in vivo*.

4. Способность бактерий секретировать белки является их ценным (но редким) качеством, позволяющим не проводить при получении белков трудоемкую операцию по вскрытию клеток. Механизм секреции белков сходен как у про-, так и у эукариот.

У бактерий клеточная стенка отделена от цитоплазмы цитоплазматической мембраной, строение которой сходно со строением плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулула у эукариотических клеток. Грамположительные клетки обладают только цитоплазматической мембраной. У грамотрицательных бактерий имеется дополнительная внешняя мембрана, между внутренней (цитоплазматической) и внешней мембранами расположены клеточная стенка и периплазматическое пространство. Большинство белков, синтезируемых бактериальными клетками, функционируют в их цитоплазме. Однако ряд белков предназначен для работы в мембранах, периплазме и даже вне клетки (рис. 10.2), поэтому они обладают способностью к

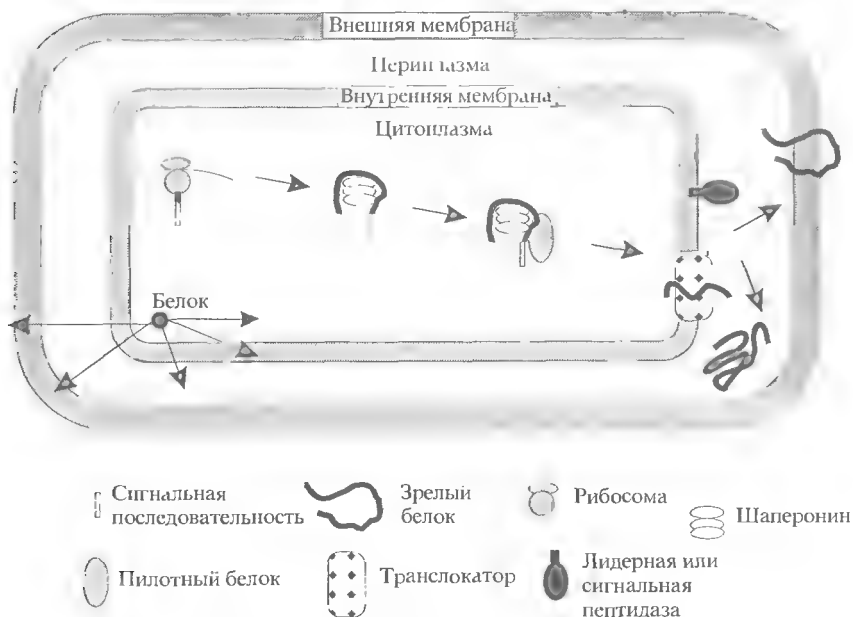


Рис. 10.2. Механизм секретиции белков у *E. coli*.

В левом нижнем углу схемы стрелками указаны возможные места конечной локализации белков

секретиции. Их экспорт осуществляется специальными механизмами, которые различны для преодоления цитоплазматической мембраны и для транспорта через внешнюю мембрану (у грамотрицательных клеток).

У большинства секретируемых белков, как про-, так и эукариот на N-конце находится так называемая сигнальная последовательность, способствующая проникновению белка через цитоплазматическую мембрану (у прокариот) или через мембраны эндоплазматической сети (у эукариот). У мембраносвязанных белков сигнальная последовательность обычно сохраняется, а у белков, поступивших в периплазму или среду, эта последовательность отщепляется.

Функция сигнальной последовательности обусловлена ее строением. Эта последовательность длиной в среднем 20–25 аминокислотных остатков.

кислот состоит из трех участков: n (N-концевой), h (гидрофобный) и c (C-концевой). Участки не имеют консервативных последовательностей. Размер n-участка варьирует от 1 до 17 аминокислотных остатков, h-участка — от 7 до 16, а c-участок характеризуется сравнительно постоянным числом: 5 у прокариот и 6 у эукариот (Heijne, 1985). Первый участок включает преимущественно положительно заряженные аминокислотные остатки, второй — гидрофобные. Очевидно, именно h-участок взаимодействует с внутренним неполярным слоем мембраны и «протаскивает» через нее молекулу белка, а c-участок указывает на место отщепления сигнальной последовательности. Последние три аминокислоты c-участка являются сайтом процессинга, консенсус которого Ala-X-Ala (в положении -3 и -1 находятся аминокислоты с маленькими неразветвленными незаряженными радикалами).

Сигнальные последовательности белков грамположительных клеток немного отличны от вышеописанных. Все их три участка длиннее, а N-конец имеет больший положительный заряд. Белки, конечно, секретируются непосредственно в среду.

У грамотрицательных клеток известны три механизма, обеспечивающих процесс секреции. Два из них являются двухэтапными и функционируют с белками, у которых есть лидерная последовательность. Первый этап у них одинаков, а второй — различен. В *E. coli* первый этап обеспечивают несколько белков (см. рис. 10.2). Шаперонины (белки теплового шока) способствуют нужной укладке N-конца секретируемого полипептида, белки SecA и PrlD направляют полипептид к секреторному каналу — транслокатору, интегрированному во внутреннюю мембрану и составленному из белков SecE, SecY, PrlA и PrlG. Процессинг полипептида ведут две пептидазы — лидерная и липопротеин-сигнальная. Транслокация белка через мембрану в большей части случаев сопряжена с его синтезом, но может происходить и после трансляции. Второй этап секреции — транспорт через внешнюю мембрану — происходит с помощью специального комплекса белков или без них. Третий механизм использует секретирующиеся белки, у которых вообще нет лидерной последовательности. Они переносятся через обе мембраны ABC-транспортерами, являющимися АТФ-зависимыми белками (см. обзор Kuchler, 1993).

При конструировании продуцентов клонируемые гены подсоединяют к участкам ДНК, кодирующим сигнальные последовательности секретируемых белков. В экспериментах с клетками *E. coli* для этого используют сигнальные последовательности β -лактамазы или щелочной фосфатазы. Первые опыты подобного рода были сделаны с геном проинсулина крысы, который был внедрен в *Pst*I-сайт гена β -лактамазы, образованный сразу после его сигнальной последовательности (Talmadge, Gilbert, 1980). Это привело к секреции в периплазматическое пространство гибридного белка, содержащего проинсулин. В той же работе обнаружено, что эукариотические белки с собственными сигнальными последовательностями могут секретироваться клетками *E. coli* и что эти последовательности узнаются и отщепляются бактериальными ферментами.

В системах, использующих секретирующиеся белки, важна их стабильность и в культуральной среде. Клетки бацилл секретируют наряду с другими белками также протеазы, к которым собственные белки устойчивы. Конструирование штамма *B. subtilis*, в котором отсутствовали все шесть его внеклеточных протеаз, позволило увеличить время полураспада β -лактамазы с 1,5 до 85 ч (Wu *et al.*, 1991).

Подходы к конструированию экспрессионных векторов

Плазмидные векторы. Как уже отмечалось, для клонирования и экспрессии генов в клетках *E. coli* обычно применяют различные модификации вектора pBR322, содержащие промоторы фага λ , лактозного и триптофанового оперона и их операторные участки. Благодаря последним экспрессию клонируемых генов можно регулировать, если плазмидная или бактериальная ДНК несет гены соответствующих репрессоров. Из многих вышеперечисленных факторов, влияющих на экспрессию генов, решающими являются сила промотора и структура сайта связывания рибосом (RBS-сайта). Напомним, что этот сайт включает в себя начальные кодоны гена, поэтому нет простых путей, обеспечивающих эффективную экспрессию чужеродных генов в бактериях. Такой экспрессии добиваются двумя принципиально различными подходами (схемами) — путем

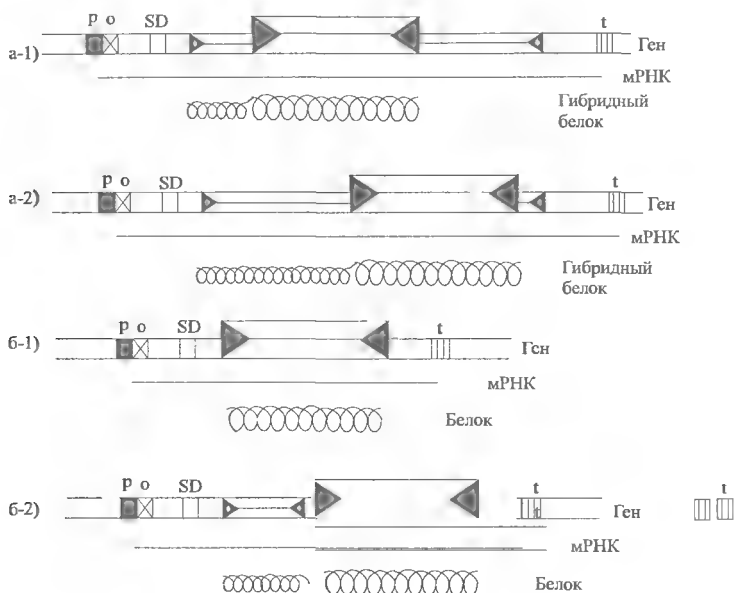


Рис. 10.3. Схемы клонирования чужеродных генов, позволяющие получать гибридные (а) или индивидуальные (б) белки.

Представлены варианты интеграции в 5'-(а-1) и 3'-(а-2) концы векторного гена, а также моноцистронная (б-1) и двуцистронная (б-2) конструкции.

p — промотор; o — оператор; SD — последовательность Шайна-Далгарно; t — терминатор транскрипции; ▶ — иницирующий кодон; ◀ — терминирующий кодон. Целевые гены и белки выделены большим размером

их внедрения в экспрессирующийся ген вектора (рис. 10.3, а) и путем подстановки генов под промотор и последовательность Шайна-Далгарно вектора (рис. 10.3, б). Каждая из схем имеет свои преимущества и недостатки.

При использовании схемы “а” обычно достигается природная для векторного гена эффективность трансляции, однако приходится преодолевать две трудности.

Во-первых, клонируемый ген может оказаться не в рамке кодонов векторного гена, и содержащаяся в нем генетическая

информация будет “прочтена” неверно. С целью поиска правильной рамки считывания интеграцию чужеродного гена в векторный ген осуществляют через разные сайты рестрикции полилинкера или используют специализированные векторы. Так, на базе плазмиды pBR322, содержащей промотор и начальный участок гена *lacZ*, создана серия из трех векторов pPCf1-3, в которых *EcoRI*-сайт находится на расстояниях, соответственно, 21, 23 или 25 п.н. от иницирующего кодона (рис. 10.4,а). Ясно, что хотя бы в одном из векторов рамка считывания окажется подходящей для экспрессии внедренного через *EcoRI*-сайт гена. Если же ген экспрессируется во всех трех векторах, значит, клонируемая ДНК несет собственный сайт связывания рибосом.

Во-вторых, использование схемы “а” приводит к образованию гибридного, или слитого (fusion) полипептида, в котором чужеродная для клетки, но целевая для исследователя аминокислотная последовательность располагается на С-конце молекулы. Как правило, чужеродный белок в гибридной форме не функционален, но его антигенная структура сохраняется. Таким образом, для некоторых аналитических целей гибридный полипептид может быть использован. Чтобы получить чужеродный белок в индивидуальной форме, его отщепляют от гибридного полипептида с помощью специфических эндопептидаз и других реагентов (табл. 10.2). Например, в векторе M13mp11FX клонирована последовательность

*Bam*HI Ile Glu Gly Arg↓
GGA TCC ATC GAG GGT AGG CCT ACC CTC GAT *GGA TCC*
CCT AGG TAG CTC CCA TCC GGA TGG GAG CTA *CCT AGG*,
Arg Gly Glu Ile *Bam*HI

в которую по ровным концам *StuI*-сайта (подчеркнут) можно интегрировать целевой ген. При этом аминокислотной последовательности целевого гена будет предшествовать тетрапептид Ile-Glu-Gly-Arg, распознаваемый и отщепляемый фактором коагуляции крови X_a. Включение этой конструкции по *Bam*HI-сайту в экспрессионный вектор позволяет получить гибридный белок, из которого затем *in vitro* выделяют индивидуальный целевой белок.

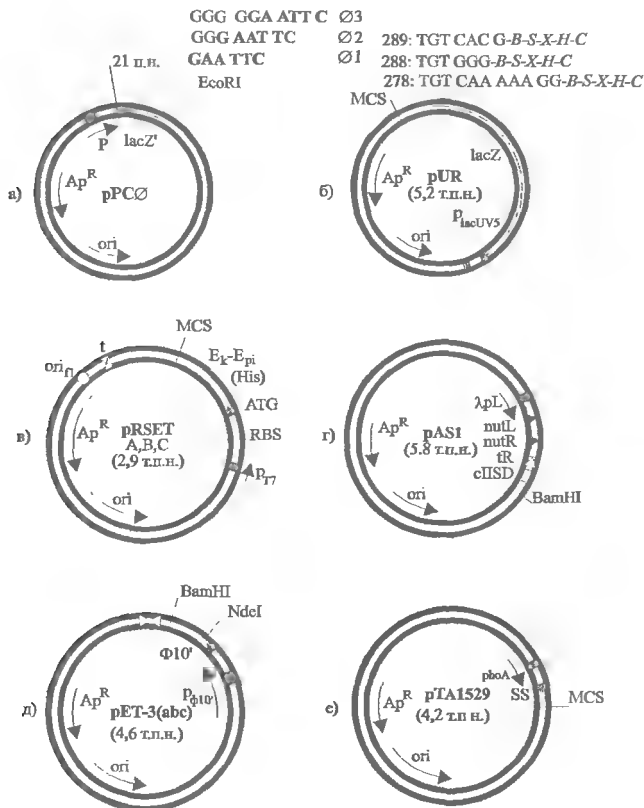


Рис. 10.4. Схемы экспрессионных векторов для клеток *E. coli*: а — векторы pPCØ1-3 с тремя различными рамками считывания клонируемых генов; б — векторы pUR278 (288, 289), предназначенные для синтеза слитых белков с функциональной N-концевой частью и обеспечивающие возможность выбора правильной рамки считывания; в — векторы pRSET (A,B,C), обеспечивающие с помощью полигистидинового тракта (His)₆ очистку клонированного гибридного белка и отделение целевого белка с использованием сайта ЕК; г — вектор pAS1, обеспечивающий синтез индивидуального белка при клонировании целевого гена через сайт BamHI; д — векторы pET-3 (a,b,c), обеспечивающие синтез

индивидуальных (при клонировании через сайт *NdeI*) или слитых (через сайт *BamHI*) белков; *e* — вектор pTA1529, предназначенный для секреции целевых белков.

p — промотор; *t* — терминатор транскрипции; *SS* — сигнальная последовательность; $\blacktriangleright$ — иницирующий кодон; *MCS* — сайт поликлонирования; *EK* — сайт расщепления белка энтерокиназой; *B* — *BamHI*; *S* — *SalI*; *X* — *XbaI*; *H* — *HindIII*; *C* — *Clal*; $\phi 10$ — элементы гена *10* фага T7. Шрифтом выделен *EcoRI*-сайт. Стрелка у промотора обозначает направление транскрипции

В зависимости от цели клонирования схему “а” применяют в двух вариантах: интеграцию чужеродного гена проводят около 5'- (рис. 10.3, *a-1*) или около 3'-конца (рис. 10.3, *a-2*) векторного гена. Первый вариант используют, когда целевой белок необходим в функциональной форме. Сайты интеграции располагают в самом начале векторного гена, чтобы кодируемая им N-концевая часть гибридных белков содержала как можно меньше аминокислот. Это, во-первых, дает шанс на сохранение в них биологической активности целевого белка, а, во-вторых, облегчает процедуру его отщепления в индивидуальной форме. Второй вариант применяют, когда для целевого белка нет способов тестирования (нет антител, субстрата и т. д.). В этих случаях за ним следят по активности (ферментативной или антигенной) N-концевой части гибридного белка. Для такой цели, к примеру, разработаны векторы серии pUR (рис. 10.4, *б*), в которых полилинкеры, расположенные в 3'-конце гена *lacZ*, обеспечивают считывание клонированного целевого гена в нужной рамке. Гибридный белок обладает β -галактозидазной и антигенной активностями, которые служат своеобразными маркерами (tag, этикетка) состоявшейся экспрессии.

Современные экспрессионные векторы, как правило, направлены на получение целевого белка в составе гибридного. Вспомогательная часть белка, которая может располагаться на N- или C-конце, состоит обычно из трех элементов, обеспечивающих возможность: 1) очистки гибридного белка; 2) маркирования целевого белка (tagging); 3) отщепления целевого белка от гибридного.

Таблица 10.2

**Ферментативные и химические реагенты, используемые
для специфического расщепления белков**

Реагент	Расщепляемая последовательность
Трипсин	-Arg-↓X-, -Lys-↓X-
Пептидаза из <i>Clostridium</i>	-Arg-↓X-
Субтилизин	-Gly-Ala-His-Arg-↓X-
Тромбин	-Leu-Val-Pro-Arg-↓Gly-Ser-
Фактор коагуляции крови X _a	-Ile-Glu-Gly-Arg-↓X-
Коллагеназа	-Pro-X-↓Gly-Pro-Y-↓
Энтерокиназа Max TM *	-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-↓X-
Цианбромид	-Met-↓X-
Уксусная кислота	-Asp-↓Pro-
Гидроксиламин	-Asn-↓Gly-

X, Y — любая аминокислота; ↓ — место расщепления белка;

* — рекомбинантный белок из каталитической субъединицы энтерокиназы быка.

Эффективность очистки гибридных белков достигается афинными методами выделения. В векторе pUR ее обеспечивает β-галактозидаза, для которой такой метод разработан. Упомянем также белок тиоредоксин, состоящий из 108 аминокислот. Его присутствие в гибридном белке полезно по двум причинам. Во-первых, при суперэкспрессии он находится в клетке в растворимой форме и придает это свойство гибридным белкам. Во-вторых, дитиоловая группа тиоредоксина специфически связывается с фениларсином, что позволило разработать для него афинные сорбенты, активные и для гибридных белков. Эффективен и полигистидиновый тракт. Белки, содержащие в своем составе последовательность из шести гистидиновых остатков подряд (His₆) обладают свойством специфически связываться с дивалентными катионами. Такие белки “вылавливают” на агарозном носителе, заряженном ионами никеля Ni²⁺.

Для отделения целевого белка от гибридного используют некоторые из приведенных в табл. 10.2 последовательностей. Уни-

кальным оказался пептид Xpress™, взятый из продукта гена 10 фага T7. Он обладает свойствами всех трех элементов, упомянутых выше. Он, во-первых, содержит тракт His₆. Во-вторых, последовательность Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Lys является эпитопом (Epi), для которого имеются антитела, что позволяет использовать его как экспрессионный маркер. В-третьих, часть эпитопа Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (сайт ЕК) распознается и расщепляется энтерокиназой.

Примером использования экспрессионной системы Xpress™ служат векторы серии pRSET (рис. 10.4,в), предлагаемые фирмой Invitrogen в наборе из трех плазмид (буквы А, В или С в названии). Они отличаются друг от друга числом нуклеотидов в полилинкере MCS; правильность рамки считывания достигается в одном из них. Транскрипция внедренного через полилинкер целевого гена обеспечивается РНК-полимеразой фага T7, ген которой, индуцируемый добавлением IPTG, расположен в хромосоме клеток *E. coli* BL21(DE3) и находится под контролем промотора *lacUV5* (Studier, Moffatt, 1986; см. табл. 7.1). Полученный гибридный белок затем афинно очищают и обрабатывают энтерокиназой для получения целевого продукта.

При использовании схемы “б” образуется индивидуальный белок, но возникают трудности при оптимизации процесса трансляции (Stormo, 1986; см. с. 320). Их преодолевают, создавая специализированные векторы с одноцистронной (рис. 10.3, б-1) или двуцистронной (рис. 10.3, б-2) конструкцией. В последнем варианте первый цистрон обеспечивает оптимальные (природные) условия для инициации трансляции, а трансляция второго цистрона сопрягается с трансляцией первого (Schoner *et al.*, 1986).

Примером одноцистронной конструкции может служить вектор pAS1 (рис. 10.4,г), сконструированный также на базе плазмиды pBR322. В нем элементы, контролирующие транскрипцию (pL, *nutL*, *nutR* и tR) и трансляцию (cII SD), взяты из фага λ (см. табл. 4.1). Целевой ген присоединяют к сайтам SD (выделено шрифтом) и RBS (подчеркнуто) гена cII через *Bam*HI-сайт (курсив):

Met

AAGG AAATACTTACATATGGATCC

Для этого после действия рестриктазы убирают выступающий 5'-конец векторной ДНК (например, нуклеазой S1) и образовавшийся ровный конец, который заканчивается иницирующим кодоном ATG, лигируют со вторым кодоном клонируемого гена. Вектор pAS1 поддерживают в клетках *E. coli* MZ-1 (см. табл. 7.1), лизогенизованных дефектным профагом λ clt857, что позволяет регулировать транскрипцию клонируемого гена с промотора pL изменением температуры. Дополнительный контроль можно осуществлять действием белка λ N (антитерминация транскрипции в сайте tR1; см. гл. 4).

Есть примеры векторов, позволяющих осуществлять обе схемы клонирования. К ним относится серия векторов pET (варианты плазмиды pBR322), содержащие различные элементы гена 10 фага T7: промотор, 11 первых его кодонов, заканчивающихся *Bam*HI-сайтом, а также его терминатор транскрипции (Rosenberg *et al.*, 1987). На рис. 10.4,д представлен вектор pET3a, простейший из этой серии. Для получения конструкции, обеспечивающей синтез индивидуального белка, целевой ген внедряют в *Nde*I-сайт (CA↓TATG), предшествующий иницирующему кодону, для чего, конечно, предварительно модифицируют его начальную часть. Внедрение целевого гена через *Bam*HI-сайт позволяет получить гибридный белок. Векторы pET продаются в наборе из трех векторов (буквы a, b или c в названии), отличающихся друг от друга числом нуклеотидов перед *Bam*HI-сайтом. Правильная рамка считывания подбирается экспериментально. Транскрипция обеспечивается РНК-полимеразой фага T7 в штамме *E. coli* BL21(DE3).

Фаговый дисплей. Экспрессию клонируемых генов могут обеспечивать, конечно, и фаговые векторы. Так, векторы λ gt11 (рис. 7.6), λ ZAP и λ ORF8 (рис. 7.7) используют с целью иммунологического скрининга гибридных белков, если целевой ген вставлен в правильной рамке. По сравнению с плазмидными векторами, здесь фаги дополнительно выступают как средство для вскрытия клеток, делая доступными внутриклеточные белки для применения антител. Неожиданной и плодотворной стала идея использовать фаги также с целью извлечения из клетки целевого белка или олигопептида путем его слияния со структурными фаго-

выми белками, в результате чего он оказывается выставленным на поверхности капсида (Smith, 1985; Parmley, Smith, 1988). Эта техника получила название “фагового дисплея”.

Для “дисплея” удобным оказался продукт гена *III* фага M13 (или fd), который присутствует в 3–5 копиях на конце нитевидной оболочки и обеспечивает адсорбцию фага на F-пили (см. гл. 4). N-конец белка gpIII располагается на внешней поверхности оболочки, поэтому внедрение фрагментов ДНК, кодирующих короткие пептиды и даже целые гены, в 5'-кодирующую часть гена *III*, приводит к появлению фаговых частиц, на конце которых “выставлены” посторонние для них пептиды или белки (рис. 10.5). Так, например, были сконструированы фаги, обладающие фосфатазной активностью (McCafferty *et al.*, 1991) и активностью трипсина (Corey *et al.*, 1993).

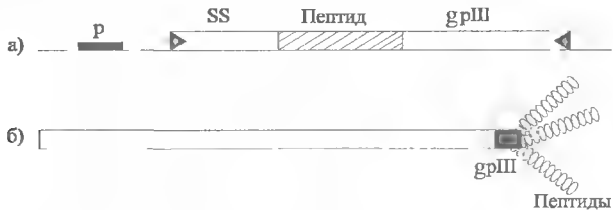


Рис. 10.5. Схема, поясняющая принцип фагового дисплея с использованием гена *III* фага M13: *а* — элементы рекомбинантного гена *III*; *б* — фаг M13 с выставленными на конце пептидами. *p* — промотор; *SS* — сигнальная последовательность; *gpIII* — продукт гена *III*; ▶ — иницирующий кодон; ◄ — терминирующий кодон

Ограничением описанной системы является тот факт, что сборка фага происходит в процессе прохождения ДНК через цитоплазматическую мембрану, и поэтому структурные белки фага обладают свойством секретироваться. Этому нередко препятствуют посторонние аминокислотные последовательности, внедренные в N-конец белка gpIII. Такое ограничение отсутствует у фага λ , поскольку его сборка происходит в цитоплазме. Здесь оказалось возможным “выставлять” чужеродные белки и на поверхности головки (Mikawa *et al.*, 1996), и на хвостовом отростке (Maruyama *et al.*, 1994). В последнем случае воспользовались белком gpV, состо-

ящим из 246 аминокислот, из которых 70 на С-конце являются несущественными для жизнеспособности фага. Для конструирования подходящего вектора, названного λfoo , 177-й кодон GAG гена *V* был заменен сайт-направленным мутагенозом (см. гл. 8) на стоп-кодон TAG. Затем после него были последовательно вставлены последовательности, кодирующие *SfiI*-сайт, инициатор трансляции SD-ATG, пептидный линкер (Pro-Thr)₁₀ из десяти чередующихся остатков пролина и треонина, а также сайт поликлонирования *HindIII*-*BamHI*-*SacI*-*EcoRI*. Пептидный линкер предназначался для соединения гибкой связью двух доменов гибридного белка. С помощью вектора λfoo были клонированы и экспрессированы в клетках *E. coli sup*⁺ ген *lacZ* и растительный ген *BPA Bauhinia purpurea*, а их продукты β -галактозидаза и лектин были экспонированы на поверхности фаговых частиц. В клетках *E. coli sup*^o синтезировались, конечно, свободные белки. Схема событий при экспрессии гена *V* представлена ниже.

$\lambda V'$ -TAG-*SfiI*-SD-ATG-(Pro-Thr)₁₀-*HindIII*-*BamHI*-*lacZ*-*BamHI*-*SacI*-*EcoRI*.

sup⁺ : λ -pV' — пептидный линкер — β -галактозидаза;

sup^o : λ -pV' + пептидный линкер — β -галактозидаза.

β -Галактозидазу можно отщепить от фага или пептидного линкера с помощью коллагеназы.

Экспрессия прокариотических генов

Эффективность экспрессии при клонировании в бактериальных клетках собственных генов или генов близкородственных организмов зависит главным образом от силы выбранного промотора, поскольку сайт связывания рибосом содержится, как правило, в клонируемых генах. Отличия в системах транскрипции-трансляции начинают сказываться при клонировании бактериальных генов, взятых из клеток отдаленных видов. Было выявлено, что эти системы не универсальны и что они в определенном смысле асимметричны. К примеру, многие гены клеток *B. subtilis* выражаются в клетках *E. coli* и комплементируют ее мутации, в то

время как экспрессии генов *E. coli* в *B. subtilis* не происходит. Это объясняется, во-первых, тем, что РНК-полимераза *E. coli* “узнает” промоторы многих как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, а РНК-полимераза *B. subtilis* — только промоторы грамположительных бактерий. Во-вторых, взаимодействие рибосом *B. subtilis* с сайтами связывания более специфично, чем рибосом *E. coli*. Поэтому при клонировании генов *B. subtilis* с собственными промоторами в стандартных бипептиконных векторах *B. subtilis* — *E. coli* можно наблюдать их экспрессию одновременно в обоих типах клеток. В то же время для экспрессии генов *E. coli* в клетках *B. subtilis* необходимо конструировать специальные векторы, где чужеродные гены были бы соединены с промоторами и с последовательностями Шайна—Далгарно бациллярного происхождения. Например, гены триптофанового оперона *E. coli* “заговорили” в клетках *B. subtilis* после их клонирования с помощью вектора рPL608 (см. 7.16,б) путем внедрения в ген *cat*, находящийся под контролем промотора субтилизисного фага SP02.

Экспрессия эукариотических генов

Из-за мозаичности строения большинства эукариотических генов их экспрессию в бактериальных клетках осуществляют, используя их кДНК или химически синтезированную белок-кодирующую часть. Для этой цели применяют одну из описанных схем конструирования рекДНК (см. рис. 10.3), которые отличаются друг от друга разными принципами “стыковки” клонируемого гена с регуляторной частью вектора. Выбор нужной схемы зависит от строения гена и от экспериментальных возможностей.

Впервые экспрессию эукариотического гена в бактериях удалось осуществить с использованием схемы “а-1” (Itakura *et al.*, 1977). Авторы химически синтезировали ген гормона соматостатина, состоящий последовательно из *EcoRI*-сайта, кодона для метионина, 14 кодонов соматостатина, двух стоп-кодонов и *BamHI*-сайта. Ген был встроен в модифицированную плазмиду рBR322 через сайты *EcoRI* и *BamHI* гена *lacZ* (рис. 10.6). В результате экспрессии гена образовался гибридный белок, содер-

жащий семь первых аминокислот β -галактозидазы, метионин и соматостатин. Гибридный белок не проявлял гормональной активности. Поэтому соматостатин отщепили от него *in vitro* бромцианом, специфически гидролизующим полипептидные цепочки после метиониновых остатков. Индивидуальный гормон был активным.

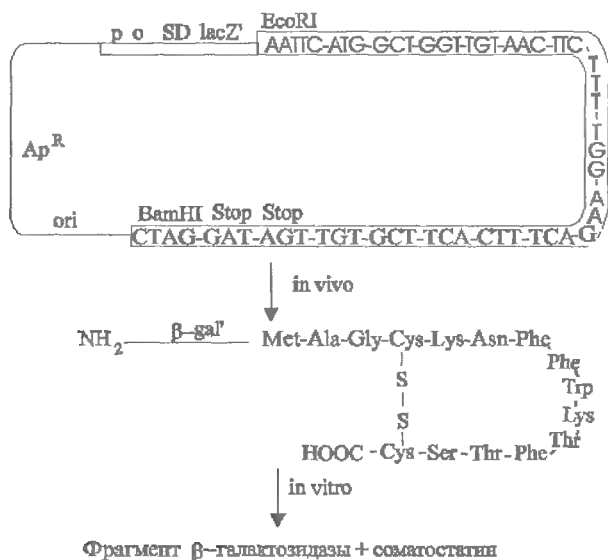


Рис. 10.6. Схема клонирования и экспрессии в клетках *E. coli* химически синтезированного гена соматостатина с последующим образованием активного гормона.

р — промотор; о — оператор; SD — последовательность Шайна—Далгарно

Аналогичным образом были химически синтезированы, клонированы и экспрессированы в клетках *E. coli* A- и В-цепи человеческого инсулина (Goeddel *et al.*, 1978). После объединения их *in vitro* дисульфидными связями образовался активный гормон (рис. 10.7). По той же схеме в клетках *E. coli* был экспрессирован ген нейрпептида лей-энкефалина (Shemyakin *et al.*, 1980).

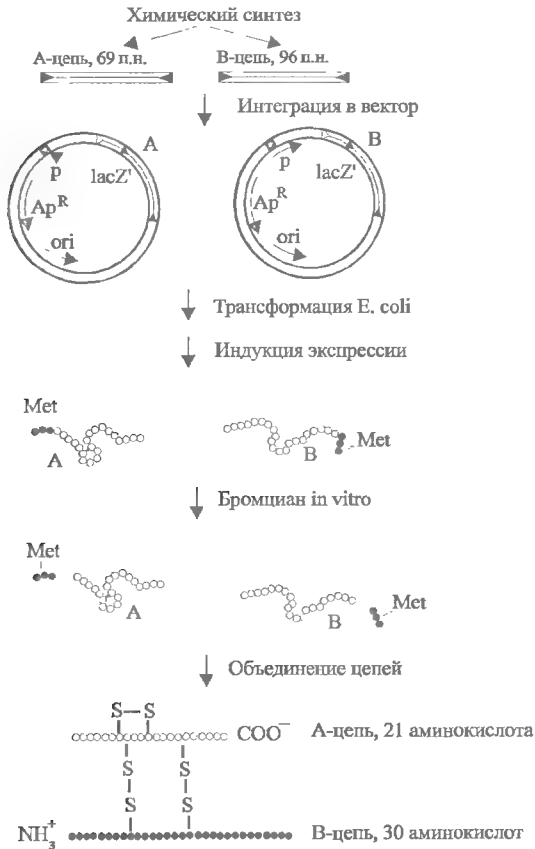


Рис. 10.7. Схема клонирования и экспрессии в клетках *E. coli* химически синтезированных А- и В-цепей инсулина с последующим созданием активного гормона.

р — промотор; ▶ — иницирующий кодон;
◀ — терминирующий кодон

В приведенных примерах целевые белковые продукты не содержали в своем составе метионина, что позволяло использовать бромциан для их отщепления. В случае синтеза в клетках *E. coli* человеческого β -урогастрона (фактор роста эпидермиса), кото-

рый состоит из 53 аминокислот и содержит в середине молекулы метионин, для этой цели был использован трипсин. Он расщепляет молекулы белка около лизина и аргинина, которых нет в гормоне. При синтезе гена β -урогастролина перед его первым кодоном поместили кодоны AAA и AAG, соответствующие лизину, что и позволило отщепить гормон из гибридного белка.

Схему «а-1» используют также для обеспечения секреции целевых белков. В этом случае клонируемый ген присоединяют к последовательности, кодирующей RBS-сайт и сигнальный пептид какого-либо гена, чаще всего гена щелочной фосфатазы *phoA*. Таким специализированным вектором является плаزمида pTA1529 (рис. 10.4, е). Ее ключевая последовательность содержит 21 кодон сигнального пептида щелочной фосфатазы (выделено жирным шрифтом), за которыми следуют сайты клонирования *EcoRI* и *BamHI* (курсив) и *SmaI* (подчеркнут):

Met	Lys	Lys	Ala	↓Trp	Gly	Ile	Pro	Gly	Asp	Pro
GTG	AAA...	AAA	GCT	TGG	GGA	ATT	CCC	GGG	GAT	CC
			<i>HindIII</i>		<i>EcoRI</i>		<i>SmaI</i>		<i>BamHI</i>	

Сигнальный пептид отщепляется в периплазме сигнальной пептидазой (указано стрелкой). Перед клонированием векторную ДНК расщепляют рестриктазой *HindIII* (сайт подчеркнут), заполняют брешь с помощью кленовского фрагмента ДНК-полимеразы I и дополнительно обрабатывают одной из трех “клонировующих” рестриктаз. Ясно, что клонируемый ген должен иметь ровный 5'-конец, начинающийся с первого кодона, а 3'-конец должен быть совместим со вторым концом вектора. Так удалось добиться секреции человеческих β -урогастролина (Oka *et al.*, 1985) и α -интерферона (Miyake *et al.*, 1985), гены которых были клонированы и экспрессированы в *E. coli* с помощью этого вектора.

Схема “б” в одноцистронном варианте (см. рис. 10.3, б-1) была впервые использована для создания клеток *E. coli*, продуцирующих гормон роста человека (Goeddel *et al.*, 1979). Этот гормон в клетках человека синтезируется в виде белка-предшественника. Сам гормон состоит из 191 аминокислотного остатка, а его белок-предшественник имеет дополнительно на

N-конце сигнальный пептид из 26 аминокислот. Клонирование и экспрессия генов, кодирующих белки-предшественники функционально активных белков, имеют свои особенности, так как в бактериальных клетках процессинг эукариотических белков затруднен. В таких случаях рекДНК конструируют, заменяя начальную часть генов, кодирующую отщепляемый при процессинге пептид, на иницирующий кодон. Причем, если ген синтезируют полностью, то при этом предусматривают все необходимые для его экспрессии замены нуклеотидных остатков.

Анализ последовательности нуклеотидов кДНК гена гормона роста показал, что его начальную часть, соответствующую сигнальному пептиду, можно удалить с помощью рестриктазы *HaeIII*. Однако в таком случае отщепляются еще 23 кодона. С учетом этого и был составлен план эксперимента (рис. 10.8). Сначала расщепляли кДНК рестриктазой *HaeIII* и клонировали фрагмент ДНК, несущий кодоны 24–191. Затем химически синтезировали и клонировали полинуклеотид с кодонами 1–24, добавив к нему иницирующий кодон ATG, а также подходящие липкие концы для внедрения фрагмента в плазмиду. Далее через сайт *HaeIII* объединили оба фрагмента (при этом восстанавливается кодон 24) и образовавшийся ген внебрили в плазмиду pBR322 рядом с промотором лактозного оперона. Экспрессия гена была достаточно успешной — продукция гормона составила более 10^5 молекул на клетку.

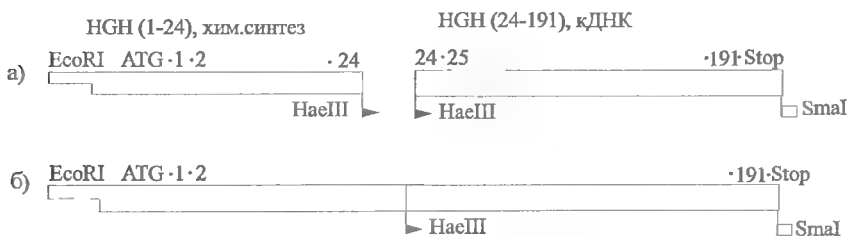


Рис. 10.8. Схема конструирования экспрессирующегося в клетках *E. coli* гена гормона роста человека (HGH): а — клонированные фрагменты гена; б — полный ген HGH

Для создания двуцистронной конструкции (см. рис. 10.3, б-2) перед клонируемым геном вставляют химически синтезированные терминирующий кодон и сайт связывания рибосом. В результате на мРНК, образовавшейся с векторного промотора, происходит синтез полипептида, кодируемого начальной частью векторного гена, и синтез чужеродного белка. Таким путем, к примеру, была осуществлена экспрессия гена t-антигена вируса SV40 в клетках *E. coli*. С этой целью к плазмиде pBR322, линеаризованной через *Pst*I-сайт, был присоединен синтетический олигонуклеотид, содержащий *Pst*I-сайт, терминирующий кодон TAA, SD-сайт и *Hind*III-сайт:



Фрагмент ДНК, содержащий ген t-антигена, был “вырезан” из вирусного генома с помощью рестриктазы *Hind*III. При этом иницирующий кодон гена оказался на расстоянии 12 п.н. от 5'-конца фрагмента. Для получения переменного количества нуклеотидов между SD-сайтом и иницирующим кодоном фрагменты укоротили с помощью экзонуклеазы III и нуклеазы SI. Через образовавшиеся ровные концы фрагменты присоединили к молекулам линеаризованного вектора со стороны синтетического олигонуклеотида, а рекомбинантные плазмиды затем циркуляризовали и трансформировали ими клетки *E. coli*. Анализ рекомбинантных плазмид из бактериальных клонов, продуцирующих t-антиген, показал, что изменение расстояния между сайтом связывания рибосом и кодоном ATG даже на один нуклеотид резко влияет на эффективность экспрессии гена.

Современное воплощение этой идеи можно проиллюстрировать на примере высокоэффективной экспрессии синтетических безынтронных генов, кодирующих человеческие интерлейкин 1 α (IL1 α) и его рецепторный антагонист (IL1ra). Авторы (Birikh *et al.*, 1995) воспользовались стандартным вектором pGEM-1 (см. рис. 7.5,б), который содержит промотор

фага Т7 и предназначен для транскрипции *in vitro*, и сконструировали на его базе вектор рGMC для сопряженной трансляции. Для этого они синтезировали дуплекс МСЕ (рис. 10.9,а), включающий в себя миницистрон, терминирующий кодон которого перекрывается со стартовым кодоном второго цистрона (целевого гена), и встроили его в полилинкер по сайтам *EcoRI* и *BamHI*. Нуклеотидная последовательность в миницистроне была составлена исходя из необходимости включения в нее энхансера и SD2-сайта, а также выбора оптимальных кодонов и учета рекомендаций Stormo (1986). Интеграция целевого гена в вектор осуществляется через *Eco31I*-сайт дуплекса МСЕ и один из оставшихся сайтов полилинкера. Рестриктаза *Eco31I* образует четырехзвенный 5'-выступающий конец слева от своего сайта действия (в данном случае 3'-TTAC-5'). Процедура интеграции целевого гена предусматривает необходимость предварительного синтеза на его 5'-конце связующего звена, включающего в себя *Esp3I*-сайт и последовательность, которая после действия рестриктазы *Esp3I* образует 5'-выступающий конец 5'-AATG-3' справа от сайта. Комплементарность выступающих концов обеспечивает их объединение и лигирование (рис. 10.9,б).

Транскрипцию двуцистронного оперона осуществляет РНК-полимераза фага Т7, что обеспечивается использованием в качестве реципиентных клеток штамма *E. coli* BL21(DE3). Конструкция вектора предусматривает две возможности инициации трансляции второго цистрона. Во-первых, он может транслироваться самостоятельно, поскольку ему предшествует собственный сайт SD2 и энхансер трансляции, упомянутый выше. Во-вторых, он способен транслироваться сопряженно с миницистроном, так как рибосома, стартовавшая в сайте SD1, достигнув терминирующего кодона в последовательности TAATG, не отделяется от мРНК, а переходит к трансляции второго цистрона. Вектор позволил получить высокий выход интерлейкина и его антагониста (33 % и 13 % от суммарного белка, соответственно). Как показал анализ, в данном случае основной вклад в трансляцию целевых генов внес сайт SD2.

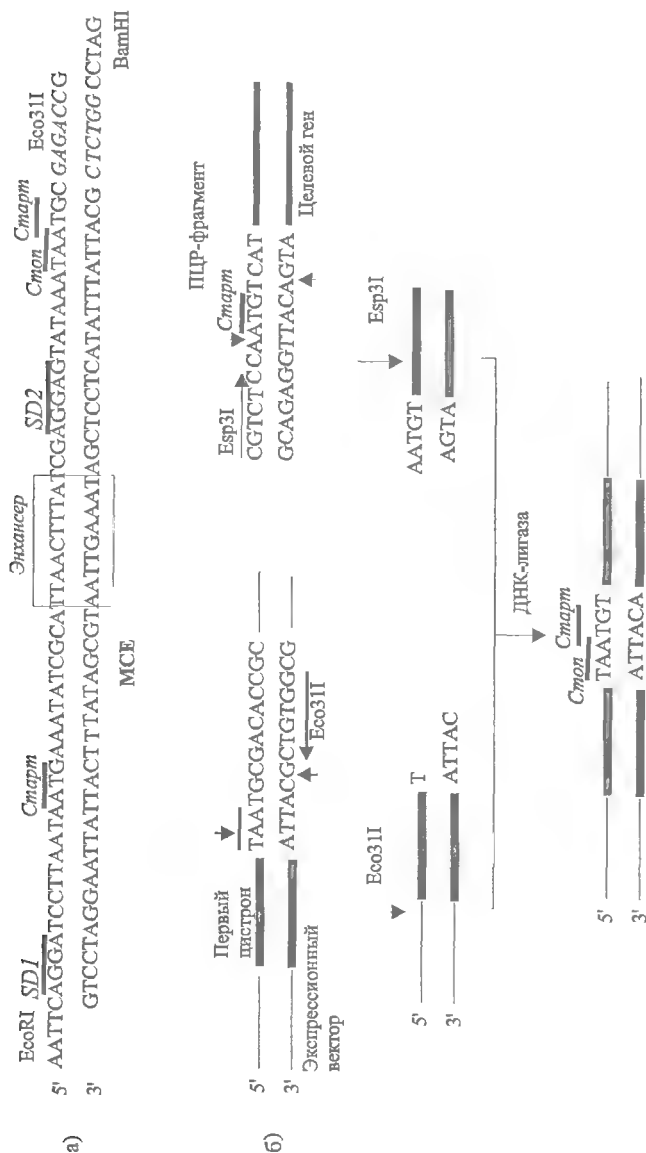


Рис. 10.9. Схема двусторонней конструкции, обеспечившей высокоэффективную экспрессию безын-
 тронных генов, кодирующих человеческие интерлейкин 1а и его рецепторный антагонист: а — структу-
 ра дуплекса МСЕ, предназначенного для сопряженной транскрипции целевого гена; б — схема встра-
 ивания целевого гена в вектор.

Курсивом выделен Eco3II-сайт дуплекса МСЕ; SD — последовательность Шайна—Далгарно

Оптимизация экспрессии генов в других бактериальных системах

Необходимость разработки других систем регулируемой экспрессии генов продиктована в первую очередь потребностями микробиологической промышленности. Из бактерий в центре ее внимания находятся клетки, синтезирующие различные хозяйственно важные вещества (бациллы, актиномицеты и коринебактерии) или способные вести биodeградацию органических отходов (псевдомонады). Поэтому обычно ставится вопрос о повышении экспрессии их собственных или близкородственных генов.

Векторы, предназначенные для работы в таких системах клонирования, описаны в гл. 7. Уже подчеркивалось, что их делают, как правило, челночными, придавая им способность реплицироваться дополнительно и в клетках *E. coli*. Это дает возможность использовать хорошо изученную систему для начальных этапов конструирования рекДНК и ее мультипликации, а уже экспрессию клонированных генов вести в исследуемой системе.

Проблемы, возникающие при создании экспрессионных векторов, аналогичны описанным выше. Однако в таких системах оптимизация экспрессии клонированных генов затруднена, как правило, из-за плохой молекулярно-генетической характеристики этих объектов. В случае грамотрицательных бактерий выход находят в использовании репликонов плазмид, имеющих широкий круг хозяев, и экспрессионных кассет, разработанных для *E. coli*. Например, вектор рММВ22, сконструированный на базе плазмиды RSF1010 (см. рис. 3.13,б), содержит промотор *tac* и ген *lacI^q*, функционирующие в клетках псевдомонад. С его помощью осуществлена эффективная экспрессия гена катехол-2,3-оксигеназы в *P. putida* (Bagdasarian *et al.*, 1984).

По схеме «а» с помощью вектора рPL608 (см. рис. 7.16,б) удалось добиться экспрессии в клетках *B. subtilis* гена *dhfr*, кодирующего дигидрофолатредуктазу мыши, — одного из немногих эукариотических белков, которые функционируют в бактериальных клетках. Данный фермент устойчив к триметоприму, в то время как аналогичный бактериальный фермент чувствителен к нему. Это и позволяет отбирать клетки, в которых экспрессируется ген *dhfr* (по их способности к росту при наличии в среде высокой

концентрации триметоприма — 25 мкг/мл). Внедрение гена *dhfr* в вектор pPL608 осуществлялось через *Pst*I-сайт.

Суперпродуценты и проблема стабильности векторов

В бактериальной клетке содержится 2–3 тыс. различных белков, каждый из которых составляет в среднем 0,04 % от их общей массы. При клонировании и экспрессии в бактериях чужеродного гена доля кодируемого им индивидуального белка может достигать 40 %. (Клетки, в которых эта величина составляет 2 % и более, называют суперпродуцентами; они тратят значительную часть энергии и веществ на производство ненужного для них продукта.) В результате скорость синтеза жизненно важных для клетки белков снижается, а время деления клеток увеличивается, что затрудняет промышленное культивирование суперпродуцентов. Для создания оптимальных условий наращивания культуры до подходящей концентрации клеток экспрессию клонируемых генов у продуцентов включают только на поздних стадиях ферментации. Это достигается, в частности, путем помещения экспрессируемого гена под контроль специфического оператора основного вектора, а во вспомогательном векторе клонируют ген репрессора.

В качестве примера рассмотрим систему из двух векторов, разработанную в лаборатории Коэна в 1981 году. Основной вектор pJJS1010 в данном случае имеет промотор-операторный участок и сайт связывания рибосом лактозного оперона, причем рядом с ним через *Bam*HI-сайт можно интегрировать клонируемые гены. Репликационная система этого вектора, полученного на базе плазмиды pKN402 (плазида типа *run-away*, см. гл. 3), способна повышать число копий вектора от 20–50 до 2000 при изменении температуры от 30 ° до 35 °С. Вспомогательный вектор pJJS1002 имеет термочувствительную систему репликации и содержит ген-репрессор *lacI^q* (см. с. 318). Клетки, содержащие оба вектора, активно размножаются при 30 °С, поскольку экспрессия клонируемого гена в таких условиях блокируется репрессором. При определенной плотности клеточной популяции температуру культуральной среды повышают. Это приводит к элиминации вектора pJJS1002, резкому увеличению числа копий вектора

pJJS1010 и к дерепрессии клонируемого в нем гена (рис. 10.10). В результате синтез белка в пересчете на одну клетку увеличивается на порядок по сравнению с клетками, содержащими только основной вектор. Описанный способ регулирования суперпродукции незаменим, когда чужеродный белок токсичен для клеток.

Существенную проблему при культивировании суперпродукторов представляет нестабильность рекДНК, сконструированных на базе плазмидных векторов. Эта нестабильность может быть функциональной или структурной.

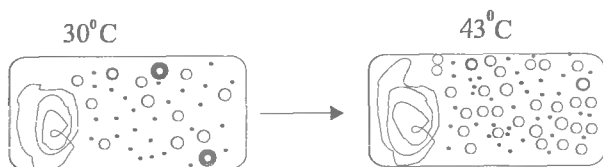


Рис. 10.10. Схема регулирования суперпродукции чужеродного белка с помощью термочувствительной системы, состоящей из двух плазмид.

о — мультикопийная плаزمида pJJS1010 с клонируемым геном; о — олигокопийная термочувствительная плазмида pJJS1002, содержащая ген репрессора;

• — продукт

Первая возникает вследствие нарушений механизма репликации или распределения векторных ДНК по дочерним клеткам (см. гл. 3). При этом векторы и рекДНК чаще исключаются из клеток, чем плазмиды, на базе которых они были сконструированы. Например, частота исключения векторов и рекДНК, имеющих ColE1 репликон, составляет $10^{-5} - 10^{-2}$ на клетку за одну генерацию, а самой плазмиды ColE1 — менее 10^{-6} . В данном случае причиной нестабильности векторов является их мультимеризация (образование кольцевых димеров, тримеров и т.д.) в RecA^+ -условиях. Она приводит к уменьшению числа репликонов и, как следствие, к увеличению вероятности образования бесплазмидных клеток в процессе деления. У плазмиды ColE1 мультимеризация предотвращается продуктом гена *cer* (см. рис. 3.12), который отсутствует в векторах, имеющих ColE1 репликон.

Суперпродуценты при культивировании быстро вытесняются бесплазмидными клетками. В лабораторных условиях такие клетки элиминируют путем добавления в культуральную среду антибиотиков, если в векторах имеются соответствующие маркеры антибиотикоустойчивости. Однако это слишком дорогой способ, и при промышленном культивировании клеток он непригоден. В биотехнологии применяют другие селективные маркеры или интегрируют клонируемый ген в клеточную хромосому.

Структурная нестабильность рекДНК заключается в том, что в процессе культивирования они могут терять участки нуклеотидной последовательности, в том числе и клонируемый ген. Клетки с такими химерами делятся быстрее, чем клетки с исходными рекДНК, и в результате “засоряют” популяцию продуцентов. Причины подобной нестабильности молекулярных гибридов многообразны (см. гл. 7) и до конца не ясны, поэтому универсальных способов борьбы с этим явлением пока не предложено.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОВТОРЕНИЯ И ОБСУЖДЕНИЯ

10.1. Как убедиться, что экспрессия клонируемого гена идет не с собственного промотора, а с векторного?

10.2. Предложите схему встраивания целевого гена в вектор pAS1 (рис. 10.3,б).

10.3. Представьте поэтапно схему клонирования и экспрессии эукариотического гена в *E. coli* с помощью вектора pTA1529 (рис. 10.3,г).

10.4. С помощью вектора λ foo в клетках *E. coli sup*⁺ был клонирован и экспрессирован ген *lacZ* (рис. 10.5), а β -галактозидаза выставлена на поверхности фага. Известно, что этот фермент активен в тетрамерной форме. Почему же он активен в данном случае?

10.5. Какова вероятность того, что при случайной интеграции кДНК в векторный ген оба гена окажутся в одной рамке считывания?

10.6. Какую роль в экспрессионных фаговых векторах λ gt11 и λ ZAP играет мутация S?

10.7. Какую роль в генно-инженерной практике играет явление внутриклеточной агрегации белков?

10.8. Опишите возможности современных экспрессионных векторов.

10.9. Какие задачи и как можно решать с помощью фагового дисплея?

10.10. В чем преимущество векторов, содержащих двуцистронные экспрессионные кассеты?

Глава 11

ДРОЖЖИ

Клетки *E. coli* K-12, как уже отмечалось, являются удобными объектами генно-инженерных экспериментов, имеющих конечной целью структурные исследования клонированных генов и их белков. Ясно, что функциональный анализ большинства эукариотических белков в этой системе затруднен, поскольку многие биологические функции (дифференцировка, митоз, мейоз и т. п.) специфичны только для эукариот. Поэтому такой анализ следует проводить в эукариотических клетках. Конечно, для анализа растительных или животных белков лучше подходят родственные для них клетки, но в ряде случаев можно использовать более простые для культивирования дрожжевые клетки. Эта возможность основана на том, что клеточная биохимия и механизмы регуляции у высших и низших эукариот очень сходны.

Дрожжевые клетки удобны и как продуценты. В отличие от клеток *E. coli*, которые слабо растут на дешевых субстратах и предрасположены к фаголизису, дрожжи зарекомендовали себя с хорошей стороны при промышленном культивировании, поскольку проявляют высокую генетическую стабильность, не подвергаются фаголизису, не выделяют токсины, растут до высоких плотностей. Еще одно их преимущество заключается в их способности гликозилировать синтезируемые ими белки, чего не могут делать прокариоты.

Для клонирования и экспрессии чужеродных генов обычно используют хорошо изученные с генетической точки зрения дрожжи — *S. cerevisiae* (Adams *et al.*, 1998). Эти клетки являются первым эукариотическим организмом, геном которого, состоящий из 16 хромосом, полностью секвенирован (Goffeau *et al.*, 1996). Последовательность из 12 млн. п.н. содержит около 6000 генов. В этих клетках лишь в три раза больше ДНК, чем у бактерий. Это

позволяет относительно легко проводить скрининг клонов, содержащих рекомбинантные молекулы ДНК.

В опытах с дрожжевыми и бактериальными клетками выяснилось, что экспрессия чужеродных генов может быть функциональной и нефункциональной. В случае функциональной экспрессии в отличие от нефункциональной чужеродные белки при подходящих условиях *in vivo* проявляют свою активность. В частности, некоторые бактериальные белки функционируют в дрожжах, а дрожжевые — в бактериях (табл. 11.1).

Таблица 11.1

Гены *S. cerevisiae*, функционально активные в клетках *E. coli*

Ген <i>S. cerev.</i>	Ген-аналог <i>E. coli</i>	Фермент
<i>ARG4</i>	<i>argH</i>	Аргининосукцинатлиаза
<i>HIS3</i>	<i>hisB</i>	Имидазоглицерофосфатдегидрогеназа
<i>LEU2</i>	<i>leuB</i>	β -изопропилмалатдегидрогеназа
<i>TRP1</i>	<i>trpAB</i>	Триптофансинтетаза
<i>TRP5</i>	<i>trpC</i>	Индолилглицерофосфатсинтетаза
<i>URA1</i>	<i>pyrD</i>	Дигидрооротатдегидрогеназа
<i>URA2</i>	<i>pyrB</i>	Аспартат-транскарбамилаза
<i>URA3</i>	<i>pyrF</i>	Оротидин-5'-фосфатдекарбоксилаза
<i>GAL1</i>	<i>galK</i>	Галактокиназа

Интенсивно разрабатываются системы клонирования у мицелиальных грибов, поскольку они играют важную роль как продуценты ферментов и низкомолекулярных веществ в микробиологической промышленности и как патогены в медицине и сельском хозяйстве. Их преимуществом является то, что они секретируют большое количество различных белков и гликозилируют их таким же образом, как и высшие эукариоты. Клонирование генов в мицелиальных грибах необходимо и для проведения фундаментальных исследований этих организмов.

Векторы

Для клонирования фрагментов ДНК в дрожжевых клетках используют, как правило, челночные векторы, способные к са-

мостоятельной репликации в дрожжах и в клетках *E. coli*. Это объясняется, во-первых, тем, что такие векторы позволяют клонировать чужеродные гены в клетках *E. coli* и затем исследовать их экспрессию в дрожжевых клетках. Во-вторых, из дрожжевых клеток трудно выделить значительное количество векторных молекул, поэтому эту процедуру ведут обычно в два этапа. Сначала из трансформированных дрожжей выделяют суммарную ДНК, а затем с ее помощью трансформируют клетки *E. coli* и по селективным признакам отбирают клоны, содержащие челночные векторы. Выделение же в больших количествах векторов и рекДНК из клеток *E. coli* не вызывает затруднений.

Таблица 11.2

Основные свойства дрожжевых векторов

Характеристика	YIp	YEр	YRp	YСр	YLp	YAC
Автономная репликация	Нет	Да	Да	Да	Да	Да
Число копий на клетку	1	25–200	1–20	1–2	10–50	1–2
Дрожжевой репликатор	Нет	<i>ori</i> , 2 мкм	<i>ARS</i>	<i>ARS</i>	<i>ARS</i>	<i>ARS</i>
Другие элементы		<i>STB</i> , 2 мкм		<i>CEN</i>	<i>TEL</i>	<i>CEN</i> , <i>TEL</i>
Частота трансформации, число колоний на 1 мкг ДНК на 10 ⁷ кл.	10 ²	10 ³ –10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ³ –10 ⁴
Частота интеграции	1	Переменная	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	?	?
Потери при митозе, в % на генерацию	<<1	1	>>1	<1	>>1 при длине <20 т п н	<1 при длине >50 т п н

ARS — хромосомный репликатор; *CEN* — центромерная ДНК; *TEL* — теломерная ДНК, *STB* — центромероподобный сайт 2-микронной плазмиды.

В качестве дрожжевых репликаторов используют хромосомные репликаторы *ARS* (см. гл. 5) и гомологичный им репликатор 2-микронной плазмиды (см. рис. 3.18). У дрожжей селективные маркеры типа устойчивости к антибиотикам не обнаружены. Поэтому в качестве таковых стали применять дрожжевые гены, функционально активные и в клетках *E. coli*, т. е. исправляющие соответствующие бактериальные дефекты (см. табл. 11.1).

Наиболее удобен маркер *URA3*, в котором нет сайтов для распространенных рестриктаз и для которого кроме позитивной селекции (коплементация ауксотрофных мутаций) возможна и негативная селекция (в присутствии 5-фтороротовой кислоты клетки *URA3*⁺ погибают).

Известны пять типов дрожжевых векторов; их сравнительные характеристики представлены в табл. 11.2.

Векторы типа *YIp* (yeast integrating plasmid) являются фактически бактериальными векторами, так как дрожжевая ДНК в них представлена только одним из указанных в табл. 11.1 генов.

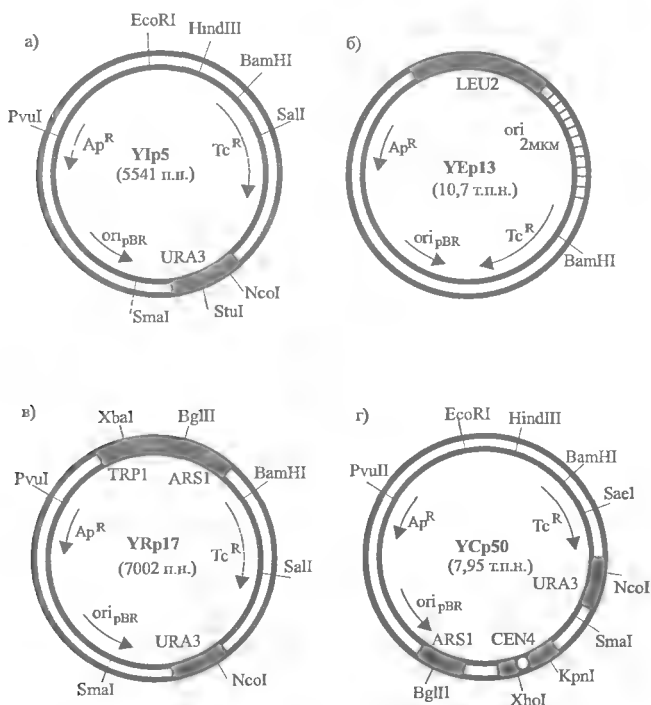


Рис. 11.1. Строение кольцевых дрожжевых векторов *YIp* (а), *YEp13* (б), *YRp17* (в) и *YCp50* (г). Указаны единственные сайты рестрикции для распространенных рестриктаз

Они, естественно, не способны реплицироваться в дрожжевых клетках, но осуществляют их трансформацию путем интеграции в хромосому через рекомбинацию дрожжевого гена с гомологичным участком хромосомы (в результате образуются гетерозиготы по этому гену; трансформанты нестабильны) и путем замены хромосомного гена на векторный с помощью двойного кроссинговера (конверсия гена; трансформанты стабильны). Первый вектор типа YIp был сконструирован с использованием плазмиды ColEI (см. рис. 3.12) и маркера *LEU2* (Hinnen *et al.*, 1978). В качестве примера представлен вектор YIp5 (рис. 11.1,а; Struhl *et al.*, 1979).

Векторы типа YEр (yeast episomal plasmid) состоят из плазмиды pBR322, репликатора 2-микронной плазмиды и дрожжевого селективного маркера. Минимально необходимыми элементами, требующимися для автономного поддержания вектора в дрожжах, являются сайты *ori* и *STB* 2-микронной плазмиды, поскольку белки, работающие в этих сайтах, поставляются *in trans* клеткой и присутствующими в ней плазмидами. Как уже говорилось, сайт *STB* обеспечивает распределение плазмидных ДНК по дочерним клеткам (см. гл. 3), поэтому векторы типа YEр относительно стабильны.

Первый такой вектор представлял собой плазмиду pMB9 (см. рис. 7.2) с встроенной 2-микронной ДНК и маркером *LEU2* (Beggs, 1978). На рис. 11.1,б представлена схема вектора YEр13, сконструированного на базе плазмиды pBR322, 2-микронной ДНК и дрожжевого маркера *LEU2* (Broach *et al.*, 1979). Высокая эффективность трансформации дрожжей этим вектором (около 10^4 колоний на 1 мкг ДНК на 10^7 клеток) позволила с его помощью создать банк дрожжевых генов. Клонирование осуществляли через *Bam*HI-сайт, расположенный в гене *Tc^R*. Трансформанты отбирали среди клеток *E. coli* по признаку *Ap^R*, а клоны с рекДНК отыскивали по чувствительности клеток к тетрациклину.

Векторы типа YRp (yeast replicating plasmid) имеют хромосомные репликаторы *ARS*. Первый такой вектор был получен случайно в процессе конструирования вектора YIp, содержащего маркер *TRP1*. Он приобрел способность к автономной репликации, что и позволило выявить первый *ARS* (Struhl *et al.*, 1979). Эти векторы нестабильны и применяются в случаях, когда

появляется необходимость иметь умеренное число копий клонируемого гена. В качестве примера представлен вектор YRp17 (рис. 11.1,в; Struhl *et al.*, 1979).

Векторы типа YCp (yeast centromere plasmid) кроме хромосомных репликаторов содержат центромеры дрожжевых хромосом (см. гл. 5). Первая центромера (*CEN3*) была найдена путем клонирования в векторе YRp фрагментов ДНК третьей хромосомы, прилежащих к центромерной области, и поиска стабильной рекДНК (Clarke, Carbon, 1980). К настоящему времени выявлены центромеры всех хромосом, и все они оказались взаимозаменяемыми. Поскольку, как известно, центромера обеспечивает физическую связь хромосомы с нитями веретена, векторы типа YCp проявляют стабильность при митозе и мейозе, хотя и в тысячу раз меньшую, чем естественные хромосомы, которые при митозе теряются с частотой около 10^{-5} . Кроме того, в процессе мейоза векторы YCp сегрегируют по Менделю и имеют низкое число копий. Другими словами, они фактически представляют собой кольцевые мини-хромосомы. С помощью одной из них, YCp50 (рис. 11.1,г), был сконструирован геномный банк *S. cerevisiae* (Rose *et al.*, 1987).

Векторы типа YLp (yeast linear plasmid). Первые линейные плазмиды такого типа были получены из векторов YRp (Szostak, Blackburn, 1982) и YCp (Murray, Szostak, 1983) путем их линейаризации и присоединения к образовавшимся концам теломер (см. гл. 5), взятых из внехромосомной линейной рДНК ресничной инфузии *Tetrahymena*. В дальнейшем эти плазмиды (рис. 11.2,а) использовали для клонирования дрожжевых теломер и анализа их структуры.

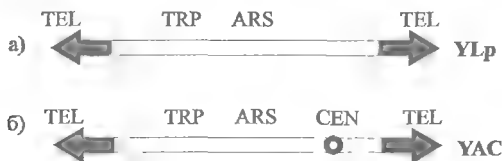


Рис. 11.2. Принципиальные схемы линейных дрожжевых векторов YLp (а) и YAc (б)

Векторы типа YAC (yeast artificial chromosome). К таковым относятся те из векторов YLp, которые содержат все структурные элементы дрожжевых хромосом — репликатор, центромеры и теломеры (рис. 11.2,б). Линейные плазмиды данного типа с размером < 20 т.п.н. митотически менее стабильны, чем кольцевые плазмиды того же генотипа. Однако с увеличением длины их стабильность существенно повышается (Murray, Szostak, 1983), что привело к идее использовать их для клонирования больших фрагментов ДНК.

YAC-клонирование. В основе YAC-клонирования лежит возможность использовать клетки *E. coli* для накопления векторной ДНК в кольцевой форме и поддерживать рекДНК в дрожжах в линейной форме (Burke *et al.*, 1987). Уже первая такая плазмида, pYAC2, содержала все необходимые для этого генетические элементы (рис. 11.3): репликатор и селективный маркер плазмиды pBR322, фрагмент дрожжевой хромосомы IV, включающий расположенные рядом локусы *TRP1-ARS1-CEN4*, а также дрожжевые селективные маркеры *URA3*, *SUP4* и *HIS3*. Последний маркерный ген был фланкирован *Bam*HI-сайтами и инвертированными теломерными локусами, взятыми из рДНК *Tetrahymena*. Ранее было выяснено, что образовавшиеся в результате расщепления этой рестриктазой концевые *TEL*-локусы восстанавливаются *in vivo* до функциональных теломер. В гене *SUP4* находился клонирующий *Sma*I-сайт; сайты *Sfi*I и *Not*I около него предназначались для вырезания вставок.

Процедура клонирования заключается в следующем. Векторную ДНК обрабатывают рестриктазами *Bam*HI и *Sma*I, что приводит к образованию трех фрагментов: два из них послужат плечами будущей хромосомы, а фрагмент с геном *HIS3* отбрасывают. Плечевые фрагменты дефосфорилируют щелочной фосфатазой и лигируют с фрагментами геномной ДНК, полученными в результате ее частичного гидролиза рестриктазами, которые совместимы с *Sma*I-сайтом. (Векторы pYAC4 и pYAC5 имеют в гене *SUP4* более удобные для клонирования сайты — *Eco*RI и *Not*I соответственно). Далее дрожжи трансформируют, причем первичный отбор дрожжевых трансформантов ведут по маркеру

URA3, а затем их тестируют на присутствие маркера *TRP1*. Это гарантирует наличие в рекомбинанте обоих плеч. Одновременно по цвету колоний трансформантов проверяют эффект действия маркера *SUP4*. Этот ген супрессирует *ADE2*-ослге мутацию в клетке-хозяине, придавая колониям белый цвет. Внедрение чужДНК в ген инактивирует его, меняя цвет колоний на красный. Эффективность YAC-клонирования отражена в табл. 11.2.

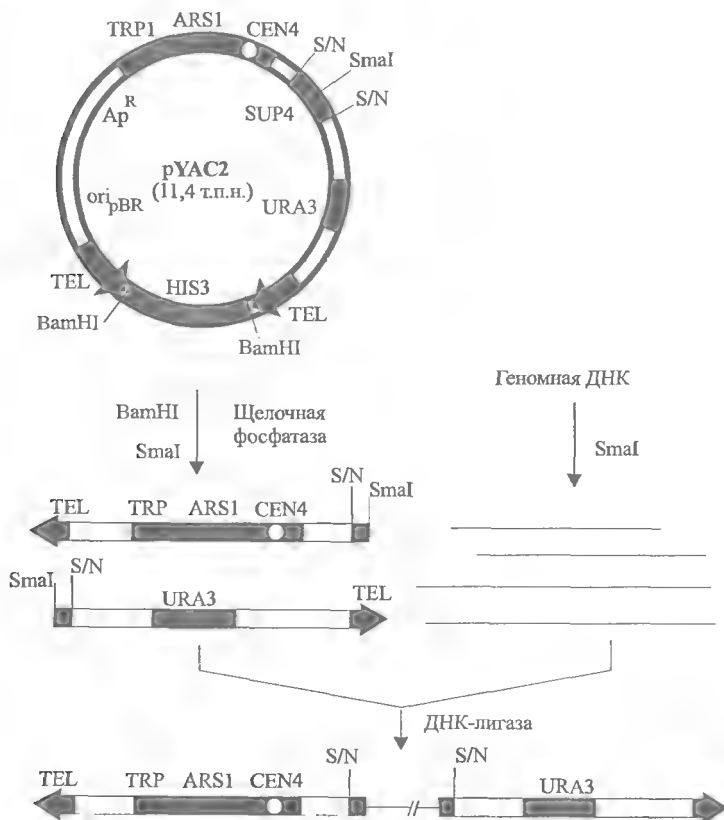


Рис. 11.3. Конструирование искусственной дрожжевой хромосомы YAC2.

S/N — сайты для рестриктаз *SfiI* и *NorI*

Высокомолекулярную геномную ДНК получают, рестрицируют и фракционируют в 1%-ной агарозе. Средний размер вставки в геномных YAC-банках зависит от степени фракционирования: при использовании нефракционированной ДНК эта величина составляет 120 т.п.н., при фракционировании фрагментов длиной более 100 или 200 т.п.н. — 220 и 370 т.п.н., соответственно. Это позволяет ограничить число клонов в банке несколькими десятками тысяч (см. табл. 9.1), для чего достаточно приблизительно 100 мкг геномной ДНК. К сожалению, от 40 до 60 % клонов являются химерными (мозаичными), т. е. в них вставки состоят из несмежных фрагментов ДНК, что серьезно осложняет анализ геномов. Этот эффект вызывается внутримолекулярной рекомбинацией *in vivo* и соединением разных фрагментов ДНК при лигировании *in vitro*. Первую причину удастся устранить, применяя дрожжевой штамм с дефектом по рекомбинации. Вторая причина просто отсутствует при TAR-клонировании.

TAR-клонирование. В методе TAR (transformation associated recombination) объединение клонируемой ДНК с YAC-вектором происходит *in vivo* за счет рекомбинационной системы клетки, что позволяет обходиться без операции лигирования *in vitro*. Известно, что в ДНК эукариот имеются многочисленные повторяющиеся последовательности. Например, ДНК человека в среднем через каждые 4 т.п.н. содержит Alu-повторы (около 300 п.н.), а повторы MER или LINES (около 5 т.п.н.) встречаются примерно через 100 т.п.н. Авторы метода (Larionov *et al.*, 1996 а, б) воспользовались этим обстоятельством и ввели такие повторы в концы линейаризованных YAC-векторов. Совместная трансформация дрожжей геномной и векторной ДНК в результате рекомбинации по этим повторам приводит к образованию YAC.

Конечно, при TAR-клонировании векторы высокоспециализированы, поскольку они предназначены для работы с ДНК только определенного вида. Векторы для клонирования ДНК человека кроме стандартных элементов (*TEL*, *ARS*, *CEN*, маркеры) содержат повторы Alu, MER или LINES в любой комбинации. Клонирование выполняется в двух вариантах — с образованием линейных или кольцевых YAC (рис. 11.4). В первом варианте повторы вводят в

открытый конец плеч YAC-вектора, а во втором — в оба конца линейаризованного вектора типа YCr. В обоих вариантах отобранные по селективным маркерам трансформанты содержали YAC, у которых средний размер вставки составлял 150–200 т.п.н.; их структурная и сегрегационная стабильность в обоих случаях была сравнимой. Интересно отметить, что эффективность клонирования не зависит от присутствия в векторе локусов *ARS*. Их заменяют близкие им по строению локусы человеческой ДНК, встречающиеся в ней в среднем через 20 т.п.н.

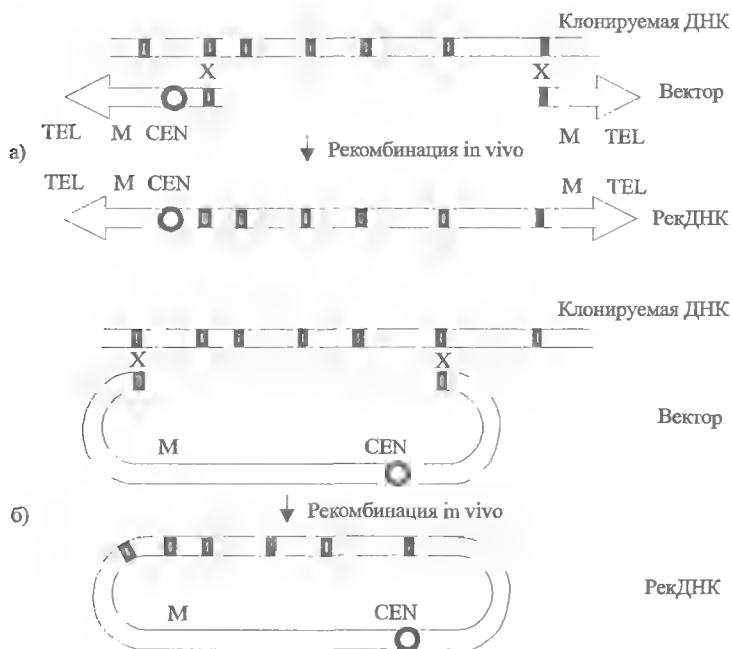


Рис. 11.4. Схема линейного (а) и кольцевого (б) TAR-клонирования.

М — селективный маркер; X — место кроссинговера; зачерненные участки — повторы в клонируемой ДНК. Масштаб не соблюден

Кольцевые YAC имеют ряд преимуществ перед линейными. Во-первых, они легко выделяются из суммарной дрожжевой ДНК, поскольку кольцевые молекулы задерживаются в стартовом положении при гель-электрофорезе с пульсирующим полем (см. приложение). Во-вторых, они более устойчивы к разрывам при манипуляциях. В-третьих, введение в исходный вектор репликатора из F-плазмиды позволяет переносить YAC в клетки *E. coli*, трансформируя их суммарной дрожжевой ДНК.

TAR-клонирование способно существенно ускорить выполнение программы “Геном человека”. Напомним, что анализ геномов начинается с создания банков генов отдельных хромосом, выделение которых является очень трудоемкой задачей. Оказалось, что с помощью TAR-векторов можно селективно клонировать ДНК человека из суммарной ДНК межвидовых гибридов соматических клеток (см. гл. 5), содержащих одну человеческую хромосому. Эта процедура позволяет обогащать человеческую ДНК в 3000 раз. Более того, на примере гена *BRCA2*, мутации в котором с высокой вероятностью приводят к появлению рака молочной железы, была продемонстрирована эффективность TAR-клонирования и для выделения специфических последовательностей из геномной ДНК человека (Larionov *et al.*, 1997). С этой целью был сконструирован кольцевой TAR вектор, который при линейаризации содержал на одном конце промотор гена *BRCA2*, а на другом — его дистальную часть. Стандартные операции кольцевого TAR-клонирования позволили за неделю работы впервые изолировать этот ген из геномной ДНК.

В дальнейшем процедура клонирования отдельных генов была упрощена. Выяснилось, что для их выделения из хромосомной ДНК на конце линейаризованного вектора достаточно иметь одну специфическую для гена последовательность, а на другом конце может располагаться повтор типа Alu (Kouprina *et al.*, 1998). Рекомбинация происходит даже при длине концевых вставок, не превышающей 200 п.н. Такой подход, названный радиальным TAR-клонированием, позволяет выделять гены с прилегающими к ним последовательностями неизвестного строения с целью их дальнейшего анализа.

Транспозонные векторы. Дрожжевой Ту-элемент (см. рис. 2.8, а), помещенный в какой-либо плазмидный вектор, является удобным инструментом для хромосомной амплификации чужеродных генов. С этой целью клонируемый ген, который подчиняют дрожжевому промотору и в котором должен отсутствовать терминатор транскрипции, вставляют между 3'-концом открытой рамки считывания ТуВ и правым δ -повтором (ориентация Ту-элемента задается направлением его транскрипции). Такая конструкция, введенная в дрожжевые клетки, действует как амплифицирующая кассета, доставляя новые копии клонируемого гена в различные локусы генома (Boeke *et al.*, 1988). Эффективность транспозиции существенно повышается, если заменить транспозонный промотор, находящийся в левом δ -повторе, на сильный дрожжевой промотор, например, гена *GAL* (рис. 11.5).

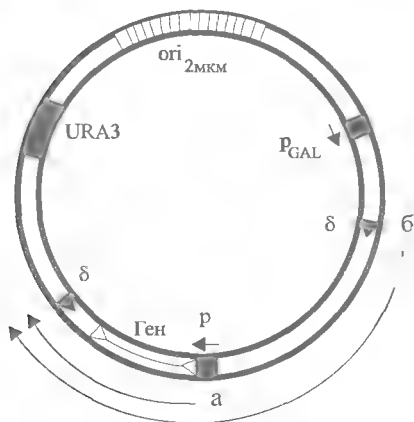


Рис. 11.5. Строение плазмиды, содержащей дрожжевой транспозонный вектор Ту.

а — транскрипт клонируемого гена; *б* — транскрипт Ту-элемента; *δ* — прямые концевые повторы Ту-элемента; тройная линия — клонируемый ген

Трансформация дрожжей

Эффективным методом является введение плазмидной ДНК в протопласты. Их получают в результате удаления клеточной стенки с помощью β -глюканазы, причем в среде присутствует сорбитол для предотвращения осмотического шока протопластов. Далее протопласты инкубируют с трансформирующей ДНК в присутствии полиэтиленгликоля и хлористого кальция и вы-

севают на твердые селективные среды, где происходит регенерация клеточных стенок и образование колоний трансформантов. Без полиэтиленгликоля, который способствует слиянию протопластов, трансформация не идет. Предполагается, что именно процесс слияния обеспечивает захват ДНК и его перенос внутрь клетки. Предварительное заключение ДНК в липосомы и их слияние с протопластами приводит к увеличению эффективности трансформации.

Возможна также трансформация целых клеток, обработанных 0,1 М ацетатом лития, в присутствии полиэтиленгликоля. Этот метод значительно проще, но эффективность трансформации на порядок ниже, чем при использовании протопластов. Широко используют и метод электропорации дрожжевых клеток.

Экспрессия чужеродных генов в дрожжах

Дрожжевые промоторы (см. рис. 1.8,б) существенно отличаются по строению от бактериальных промоторов. Различия в строении промоторов, а также сигналов сплайсинга (см. гл. 1) высших и низших эукариот не являются принципиальными, но, тем не менее, они не взаимозаменяемы. Этим объясняются неудачи большинства опытов по экспрессии чужеродных генов с собственными промоторами в дрожжах. Поэтому для успешной экспрессии чужеродных генов в дрожжевой клетке их сигнальные последовательности, ответственные за транскрипцию и трансляцию, необходимо заменять аналогичными участками дрожжевого происхождения.

Для оптимизации экспрессии чужеродных генов в дрожжах необходимо преодолевать те же препятствия, что и при их экспрессии в бактериях (см. гл. 10). Однако на практике это сделать затруднительно из-за недостаточности знаний о причинах анализируемых явлений. Например, время полураспада мРНК дрожжей варьирует в пределах от 1 до 100 мин, но причины разной их стабильности не известны. Столь же не ясна и ситуация со стабильностью белков: предсказать, насколько будет стабилен чужеродный белок, заранее невозможно. Можно попытаться предотвратить деградацию нестабильного белка,

сделав его секретлируемым, но это удастся не всегда, если белок в норме функционирует в цитоплазме. Часто белок гидролизруется в процессе его выделения из клеток благодаря действию протеаз, которые освобождаются из разрушенных везикул. Этот эффект можно предотвратить, используя беспротеазные штаммы дрожжей. Уже отмечалось, что эффективность трансляции зависит от структуры мРНК. В частности, удаление 5' и 3' не-транслируемых областей мРНК корового антигена вируса гепатита В позволило увеличить содержание этого белка в клетке почти на два порядка (Kniskern *et al.*, 1986) при неизменном содержании самой мРНК. Но и здесь приходится действовать методом проб и ошибок. Также известно, что использование оптимальных кодонов должно привести к увеличению выхода чужеродного белка. Это было продемонстрировано на примере 50-кратного повышения содержания белка при клонировании синтетического гена легкой k-цепи иммуноглобулина мыши по сравнению с клонированием ее кДНК (Kotula, Curtis, 1991). Однако есть примеры и с другим результатом.

Экспрессия бактериальных генов. Как уже говорилось (см. гл. 1), у эукариот в узнавании промоторов РНК-полимеразой важную роль играют транскрипционные факторы. Сайты для них отсутствуют в бактериальных промоторах, поэтому они не функциональны в дрожжах. В то же время дрожжевые промоторы зачастую функциональны в *E. coli*. Впервые это было показано в опытах по экспрессии в дрожжах гена β -галактозидазы (Rose *et al.*, 1981).

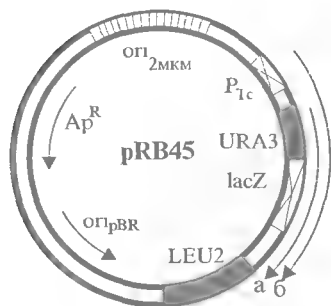


Рис. 11.6. Структура плазмиды pRB45, обеспечивающей синтез гибридного белка *URA3-lacZ* в клетках дрожжей (а) и *E. coli* (а и б)

В этих опытах на базе вектора YEp сконструировали плазмиду pRB45, содержащую маркеры *LEU2* и *URA3* (рис. 11.6). В ген *URA3* внедрили

ли ген *lacZ* без семи начальных кодонов. Гибридный ген *URA3-lacZ* в бактериальных клетках транскрибировался с промоторов гена *Tc^R* и гена *URA3*, а в дрожжевых клетках — только с эукариотического промотора. Гибридный белок проявлял β-галактозидазную активность при синтезе в обоих типах клеток.

Экспрессия генов животных. Несмотря на то, что дрожжевые клетки относятся к эукариотическим организмам, функциональная экспрессия генов высших эукариот в дрожжах происходит значительно реже, чем бактериальных генов. До сих пор успешно проведена только комплементация мутации *ADE8* дрожжей соответствующим геном дрозофилы, который не имеет интронов.

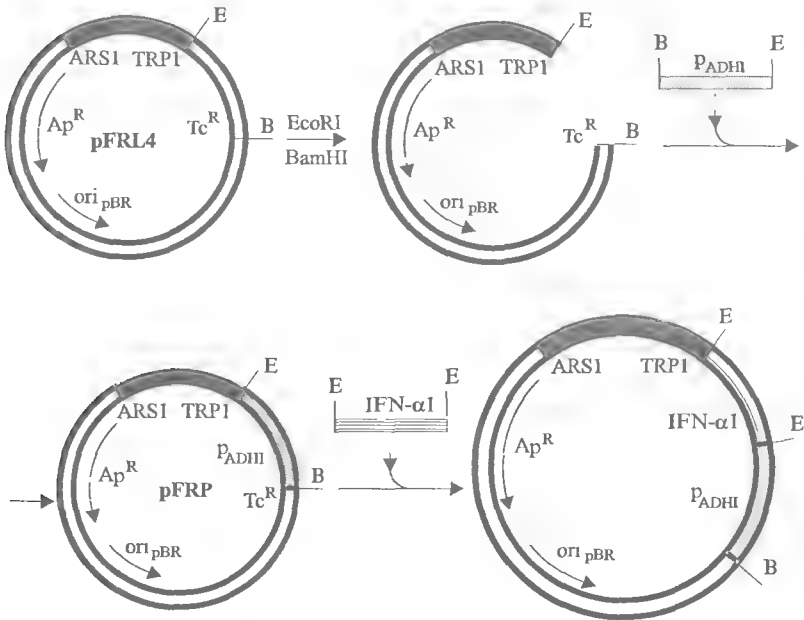


Рис. 11.7. Схема опыта по клонированию и экспрессии в дрожжах человеческого гена лейкоцитарного интерферона IFN-α1.

B — *BamHI*; E — *EcoRI*

Экспрессию чужеродных генов в дрожжах, как и в бактериях, проводят с получением гибридного или индивидуального белка (см. рис. 10.2). Первым индивидуальным животным белком, синтезированным в дрожжах, был человеческий лейкоцитарный интерферон IFN- α 1 (Hitzeman *et al.*, 1981). Его кДНК была поставлена под контроль промотора гена алкогольдегидрогеназы дрожжей *ADH1* (рис. 11.7). С этой целью из плазмиды, в которой был клонирован ген *ADH1*, в результате нескольких последовательных процедур выделили его промотор в составе *Bam*H1-*Eco*R1-рестрикта и встроили его в плазмиду pFRL4, являющуюся производной вектора YRp7. Полученная плаزمида pFRP имела единственный *Eco*R1-сайт, поэтому ген IFN- α 1 был подготовлен для клонирования в виде *Eco*R1-рестриктов. Исходная кДНК интерферона IFN- α 1 содержала последовательность с информацией о сигнальном пептиде. Она была заменена синтетическим двунитевым олигонуклеотидом, имеющим *Eco*R1-сайт и иницирующий кодон ATG. 3'-концевая нетранслируемая часть кДНК имела естественный *Eco*R1-сайт, что и позволило осуществить клонирование гена IFN- α 1. Для повышения эффективности образования рекДНК линеаризованные плазмиды pFRP предварительно обрабатывали щелочной фосфатазой. Трансформированные дрожжевые клетки отбирали по маркеру *TRP1* и определяли в них уровень синтеза интерферона. Он составил примерно 10^6 молекул на клетку, что на два порядка больше, чем при экспрессии такого же гена в клетках *E. coli*.

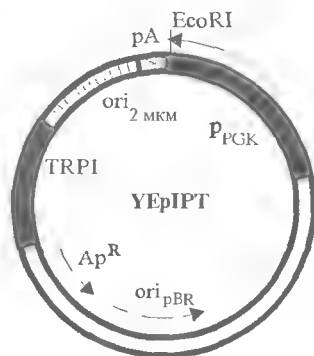
Секреция белков дрожжами осуществляется стандартным для эукариот способом. После синтеза белка-предшественника его сигнальная последовательность удаляется при проникновении белка через мембрану эндоплазматической сети. Зрелый белок транспортируется в комплекс Гольджи и попадает в мембранные пузырьки (везикулы). Везикулы движутся к плазматической мембране и, сливаясь с ней, доставляют в периплазматическое пространство белки, которые “застревают” здесь или в клеточной стенке (например, кислая фосфатаза и инвертаза) или поступают в культуральную среду (например, α -фактор, см. гл. 5). Ко-

личество секретируемого белка зависит от фазы роста и максимально (около 30 %) в стационарной фазе.

Как уже отмечалось (см. гл. 10), сигнальные последовательности функционально сходны у многих организмов, даже у таких отдаленных друг от друга, как бактерии и животные. Это справедливо и для дрожжевых клеток, что было установлено в опытах по экспрессии в дрожжах генов различных интерферонов человека (Hitzeman *et al.*, 1983). Для клонирования использовали челночный вектор YEpIPT, сконструированный на базе плазмиды pBR322 и 2-микронной ДНК (рис. 11.8), несущей *ori*-сайт, а также сигналы терминирования транскрипции и полиаденилирования, принадлежащие гену *FLP* (см. рис. 3.18). Эти сигналы оказались необходимыми для эффективной экспрессии чужеродных генов. Селективным маркером служил ген *TRP1*, а промотор был взят от гена *PGK*, кодирующего 3-фосfogлицераткиназу. Под этот промотор через единственный *EcoRI*-сайт были внедрены гены *IFN- α 1*, *IFN- α 2* и *IFN- γ* с собственными сигнальными последовательностями. Во всех случаях наблюдалась секреция активного интерферона, т. е. дрожжевые клетки правильно процессируют чужие для них сигнальные последовательности. Этот вывод (за немногими исключениями) был затем подтвержден для многих других животных и растительных белков.

Рис. 11.8. Челночный вектор YEpIPT для экспрессии чужеродных генов в дрожжах.

Внешней стрелкой обозначено направление транскрипции с промотора p_{PGK} ; pA — сайт полиаденилирования



Для секреции дрожжевыми клетками чужеродных белков, не имеющих собственной сигнальной последовательности, конструируют специальные векторы, которые кодируют такие последовательности. Так, для синтеза и секреции человеческого

интерлейкина-1 β клетками *S. cerevisiae* был использован вектор YEpsc1 (рис. 11.9), который содержит синтетический олигонуклеотид SS, кодирующий сигнальную последовательность из 18 аминокислот секретируемого токсина дрожжей *Kluyveromyces lactis*. Олигонуклеотид, фланкированный в процессе синтеза по разные стороны иницирующим кодоном и полилинкером, встроен вслед за сильным промотором гена *CYC1* цитохрома С *S. cerevisiae*. Ему, в свою очередь, предшествует транскрипционный активатор UAS-GAL, индуцируемый галактозой. кДНК интерлейкина-1 β была подсоединена через полилинкер в рамке к сигнальной последовательности. При росте в галактозной среде клетки, содержащие рекомбинантную плазмиду, секретируют в культуральную среду до 1–2 мг/л интерлейкина-1 β практически без примеси других белков (Baldari *et al.*, 1987).

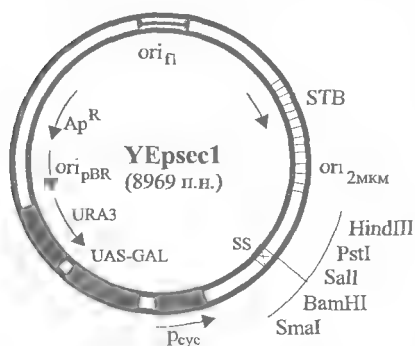


Рис. 11.9. Строение вектора YEpsc1, с помощью которого был осуществлен синтез и секреция человеческого интерлейкина-1 β клетками *S. cerevisiae*.

Внешней стрелкой обозначено направление транскрипции с промотора p_{Cyc} . SS — сигнальная последовательность

Многие секретируемые эукариотические белки гликозилируются в определенных сайтах при прохождении их через эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи. Состав олигосахаридов различен в белках животных, растений и дрожжей. Как показали опыты, чужеродные белки гликозилируются в дрожжах в обычных для себя сайтах, но содержат олигосахариды дрожжевого типа. Необычное гликозилирование не сказывается на активности белков *in vitro*, однако при терапевтическом применении эта разница может сказаться на их стабильности, иммуногенности и других эффектах.

Клонирование и экспрессия генов в мицелиальных грибах

Техника клонирования и экспрессии чужеродных генов в других дрожжах и мицелиальных грибах мало отличается от методов, разработанных для *S. cerevisiae*. Конечно, принимается во внимание особенность биологии мицелиальных грибов. Она заключается в том, что растворимые вещества, включая макромолекулы (но не органеллы), более или менее свободно циркулируют между клетками по практически общей цитоплазме. В связи с этим генетическую селекцию нельзя применять к индивидуальному ядру и надежно поддерживать векторы во внехромосомном состоянии. Причина проста: ядра, не содержащие плазмиды, будут делиться за счет веществ, которые поступают от ядер с плазмидами. Из-за этого большинство векторов являются интегративными. Отметим и другую сложность: у мицелиальных грибов хромосомные и митохондриальные репликаторы *ARS* неэффективно функционируют в плазмидных векторах, а собственные плазмиды в их ядрах не обнаружены.

Из-за недостаточной генетической изученности большинства видов мицелиальных грибов возможность применять для селекции трансформантов биохимические маркеры крайне ограничена. Более удобны маркеры, применение которых не связано с генотипом клеток. К их числу относятся маркеры *Ben^R* из *Aspergillus nidulans* (устойчивость к фунгициду беномилу), *oliC* из *A. niger* (устойчивость к олигомицину), *amdS* из *A. nidulans* (использование ацетамида в качестве единственного источника азота). Распространение получили и бактериальные маркеры, поставленные под промоторы грибов (устойчивость к антибиотикам гиромоцину, блеомицину, канамицину, G418 и др.).

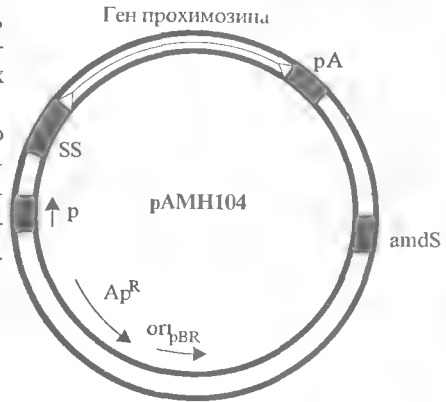
Способы трансформации мицелиальных грибов сходны. Их клеточные стенки устойчивее дрожжевых, поэтому для получения протопластов используют препараты, содержащие смесь гидролитических ферментов. Наиболее распространен Novozyme 234, полученный из гриба *Trichoderma viridae*, в котором главными компонентами являются 1,3-глюканаза и хитиназа.

Экспрессия гетерологичных генов в мицелиальных грибах не вызывает проблем, если гены происходят из одной группы грибов, например аскомицетов, поскольку их транскрипционные сигналы взаимозаменяемы. Достигнута экспрессия и многих животных генов, поставленных, конечно, под промоторы грибов. Обычно используют промоторы индуцибельных генов глюкоамилазы *A. awamori* и *A. niger*, алкогольдегидрогеназы и ацетамидазы *A. nidulans*, целлобиогидролазы I *T. viridae* и *T. reesei*. Целью таких экспериментов является конструирование промышленных продуцентов. Например, для получения химозина теленка, применяемого в приготовлении сыров, использовали клетки *E. coli* и *S. cerevisiae*, в которых экспрессировали кДНК гена прохимозина, но в обоих случаях секреция белка была низкой, а основная его доля находилась в нерастворимой форме внутри клеток. В то же время при экспрессии в *T. reesei* кДНК того же гена, поставленного под промотор и сигнальную последовательность (SS) гена *cbh1* целлобиогидролазы I, основная доля ферментативной активности обнаруживалось в культуральной среде (Harkki *et al.*, 1989). Сам прохимозин не активен, но при кислых pH он подвергается аутокаталитическому процессингу, превращаясь в химозин. Любопытно отметить, что генно-инженерный химозин, как и природный, оказался негликозилированным.

Интегративный вектор pAMH104 (рис. 11.10), использованный в этом эксперименте, является типичной конструкцией для мицелиальных грибов. Целевой ген поставлен между SS-последовательностью и терминатором транскрипции гена *cbh1*. Эта экспрессирующая кассета и селективный маркер *amdS* из *A. nidulans* вставлены в плазмиду pUC19 для облегчения манипуляций в *E. coli*. В клетках *T. reesei* вектор pAMH104 интегрируется в хромосому через ген *cbh1*, поэтому трансформанты не синтезируют целлобиогидролазу I. Тем не менее выход химозина был более чем на два порядка хуже, чем целлобиогидролазы I в исходных клетках. Конечно, система далека от оптимальности, что объясняется слабой изученностью молекулярной генетики грибов.

Рис. 11.10. Вектор рАНН104, использованный для синтеза и секреции химозина телянка в клетках *T. reesei*.

р, SS и рА — соответственно промотор, сигнальная последовательность и сайт полиаденилирования гена *cbh1* целлюбиогидролазы I; *amdS* — селективный маркер.



ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОВТОРЕНИЯ И ОБСУЖДЕНИЯ

11.1. Какие бактериальные селективные маркеры используют в дрожжевых системах клонирования?

11.2. Как вводят трансформирующую ДНК в дрожжевые клетки?

11.3. Какие элементы 2-микронной плазмиды используют в дрожжевых векторах?

11.4. Дрожжевые промоторы зачастую функциональны в *E. coli*, а бактериальные промоторы в дрожжах — нет. В чем может быть причина?

11.5. Охарактеризуйте области применения дрожжевых векторов различного типа.

11.6. Для какой цели используют транспозонные векторы дрожжей?

11.7. Предложите конструкцию экспрессионного дрожжевого вектора, обеспечивающего секрецию чужеродного белка.

11.8. Составьте план эксперимента по получению банка генов с помощью вектора рУАС4.

11.9. Составьте план эксперимента по выделению определенного гена из геномной ДНК с помощью TAR-вектора.

11.10. Какие подходы используют при конструировании векторов для работы с мицелиальными грибами?

Глава 12

РАСТЕНИЯ

До сих пор рассматривались проблемы внесения новой генетической информации в одноклеточные организмы. В таких случаях внедрение чужеродного гена в одну клетку и ее последующее клонирование является рутинной операцией. А как клонировать многоклеточные организмы, состоящие из высокоспециализированных клеток, особенно высшие растения и животных? Ведь возможности манипуляций *in vitro* с зародышевыми клетками крайне ограничены.

Своими успехами генетическая инженерия растений обязана в первую очередь достижениям клеточной инженерии (см. гл. 5) в разработке методов регенерации целых растений из единичных дифференцированных клеток или их протопластов. Второй составляющей успеха явилось использование природной системы трансформации растений Ti-плазмидами *Agrobacterium tumefaciens* (см. гл. 3) и создание на их базе векторов, способных интегрироваться в растительные хромосомы. Это дало возможность вводить в клетки растений чужеродные гены и получать из единственной клетки сформировавшееся растение. Такие организмы, в которых чужеродные гены обнаруживаются во всех его клетках, включая половые, называют трансгенными. Они обладают свойством передавать приданные им новые признаки своему потомству.

Успех в манипулировании генами достигнут главным образом в работах с двудольными растениями семейства *Solanaceae*, а модельными объектами являются табак, томаты и петунья ("Генная инженерия растений. Лабораторное руководство", 1991). У однодольных, а к ним относятся и зерновые культуры, основная проблема связана с поиском условий их регенерации из изолированных клеток. Успех здесь сопутствовал лишь опытам с ри-

сом и кукурузой, да и то лишь в редких случаях регенерировавшие растения были плодовитыми.

Векторы

Т-ДНК Ti-плазмид как природные векторы. Как уже отмечалось (см. гл. 3), в естественных условиях двудольные растения подвергаются трансформации Ti- и Ri-плазмидами агробактерий. Трансформированные Ti-плазмидами клетки становятся опухолевыми и образуют корончатые галлы (см. гл. 5). В изолированном виде такие клетки размножаются без фитогормонов, синтезируя опины, а в случае их прививки на здоровые растения также образуют корончатые галлы.

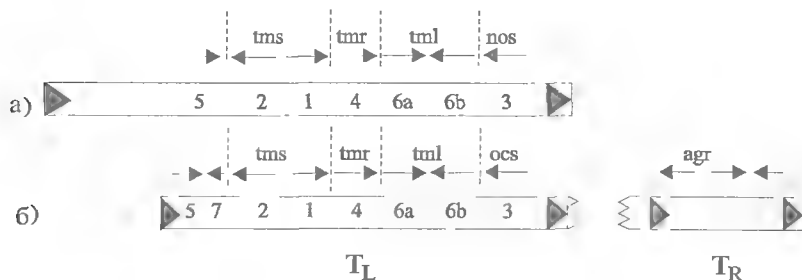


Рис. 12.1. Генетические карты и характер транскрипции Т-ДНК Ti-плазмид *A. tumefaciens*:

а — Т-ДНК нопалиновой плазмиды pTiC58; *б* — T_L -ДНК и T_R -ДНК октопиновой плазмиды pTiAch5. Стрелками указаны направления считывания генов. Знаки ▴ в дуплексе обозначают прямые концевые повторы Т-ДНК. Цифрами обозначены гены

Инфекционное начало содержится в Т-ДНК Ti-плазмид. Генетические карты Т-ДНК и характер транскрипции ее генов в растительных клетках сходны у нопалиновой и октопиновой плазмид (рис. 12.1). Т-ДНК состоят из гомологичных локусов *onc*, обеспечивающих признак онкогенности, и генов *ocs* или *nos*, кодирующих октопинсинтетазу или нопалинсинтетазу соответственно. Локус *onc* включает в себя шесть генов. Продукты генов 1 и 2 превращают триптофан в индолуксусную кислоту (ауксин,

см. рис. 5.5), а изопентилтрансфераза, кодируемая геном 4, синтезирует один из вариантов цитокинина. Высокий внутриклеточный уровень этих фитогормонов приводит к повышенной митотической активности трансформированных клеток и, как следствие, к образованию опухоли. Свой вклад в дедифференцировку клеток вносят также продукты генов 5, 6a и 6b.

Фенотип каллуса, полученного из трансформированных клеток, зависит от мутаций в генах *onc*. Мутации в генах 1 и 2 приводят к формированию побегов, мутации в гене 4 обуславливают развитие корней, мутации в генах 6a и 6b приводят к увеличению размера каллуса. Отсюда происходят и названия групп этих генов — *tms*, *tmr* и *tml* (tumour morphology shooty, rooty и large, соответственно).

В опухолевых клетках Т-ДНК интегрирована в разных, преимущественно активно транскрибируемых участках ядерной ДНК, но сайты интеграции неспецифичны по отношению к нуклеотидным последовательностям. Нопалиновые и октопиновые Т-ДНК в геноме растительных клеток устроены по-разному. Нопалиновая Т-ДНК в растительном геноме представляет собой непрерывную последовательность нуклеотидов (23 т.п.н.), причем имеется несколько ее копий. Октопиновая Т-ДНК состоит из сегментов T_L (13,6 т.п.н.; одна копия на 1 геном) и T_R (6–7 т.п.н.; 15–30 копий на геном). Первый сегмент, содержащий локус *onc* и ген *ocs*, присутствует обязательно, а второй сегмент с геном *agr*, который кодирует агропинсинтазу, может отсутствовать.

Т-ДНК фактически являются природными экспрессионными векторами. Они стабильно поддерживаются в реципиентных клетках, переносят в них чужеродную ДНК, которая транскрибируется с образованием функционально активных белков, а селективным маркером служит признак онкогенности трансформированных клеток. Гены, управляющие переносом Т-ДНК, лежат вне ее (в *vir*-области Ti -плазмид), а структурными элементами, необходимыми для переноса, служат ее прямые концевые повторы. Поэтому, как было показано в пионерских работах лаборатории Дж. Шелла в начале 80-х годов, после делетирования центральной части Т-ДНК последняя сохраняет способность к переносу. Одновременно делетирование центральной части пре-

дотвращает образование опухолеродных клеток, что важно, поскольку из таких трансформированных клеток нельзя получать целые растения.

В этих опытах из клеток табака, трансформированных мутантной октопиновой плазмидой, была получена каллусная ткань, из которой с применением фитогормонов по стандартной методике (см. с. 380) были выращены плодовые трансгенные растения. Во всех их клетках обнаруживался ген *ocs* (о его присутствии судили по синтезу клетками октопина). В результате самоопыления данных растений и полового скрещивания их с обычными растениями табака было установлено, что ген *ocs* наследуется как доминантный менделевский признак с сегрегацией, типичной для полигибридного скрещивания.

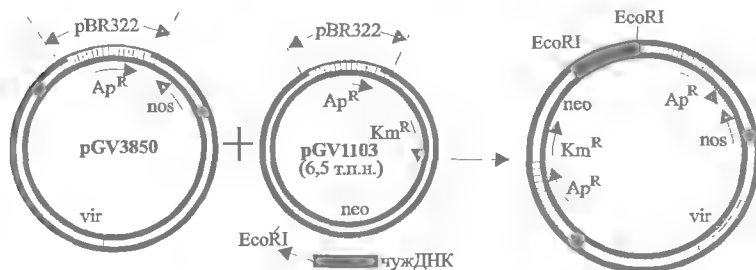


Рис. 12.2. Строение коинтегративных векторов pGV3850 и pGV1103 и их коинтеграта.

Стрелками указаны направления считывания генов.

Знаки ► в дуплексе обозначают прямые концевые повторы Т-ДНК; чужДНК представлена темным фрагментом

Этот успех привел к мысли о конструировании векторов на базе Т-ДНК путем замены их центральной части чужеродными генами. Расчет строился на том, что в составе Т-ДНК они будут естественным образом переноситься в растительные клетки и интегрироваться в их геном. Первой конструкцией, в которой была осуществлена эта идея, явилась плазмида pGV3850 (рис. 12.2), созданная путем замены локуса *onc* нопаиновой плазмиды pTiC58 плазмидой pBR322 (Zambryski *et al.*, 1983). Агробактерии, несущие плазмиду pGV3850, передавали измененную

Т-ДНК в растительные клетки, о чем свидетельствовало появление в них нопалина. Из трансформированных клеток были выращены плодовые трансгенные растения.

Маркеры. В случае использования неонкогенной Т-ДНК синтез опинов служит, конечно, показателем трансформированности растений, но этот признак не является селективным. По этой причине при конструировании растительных векторов используют не сами гены *ocs* и *nos*, а их промоторы и сайты полиаденилирования, между которыми помещают бактериальные селективные маркеры. Набор таких маркеров, функционирующих в растительных клетках, невелик. Это неомицинфосфотрансфераза (гены *nr1* или *nr11* транспозонов Tn601 или T5, их общее название *neo*; устойчивость к аминогликозидным антибиотикам канамицину, неомицину и G418), гигромицинфосфотрансфераза (ген *hpt E. coli*, устойчивость к гигромицину), хлорамфениколацетилтрансфераза (ген *cat* транспозона Tn9, устойчивость к хлорамфениколу), дигидрофолатредуктаза (ген *dhfr* плазмиды R67, устойчивость к метотрексату), фосфинотрицинацетилтрансфераза (ген *bar Streptomyces hygroscopicus*, устойчивость к гербициду фосфинотрицину и его производным) и др.

Коинтегративные векторы. К таким векторам относят плазмиду pGV3850 и ей подобные плазмиды, которые слишком велики для манипулирования *in vitro*, и поэтому чужеродные гены вводят в них гомологической или сайт-специфической рекомбинацией, используя промежуточные векторы (pGV1103 в нашем примере, рис. 12.2). Их конструируют на базе плазмиды pBR322 или ее производных, вводя в них фрагмент с Т-ДНК и дополнительные селективные маркеры для работы с агробактериями и растительными клетками. Чужеродные гены вставляют в Т-ДНК, а затем рекомбинантный промежуточный вектор переносят методом конъюгации в клетки *A. tumefaciens*, содержащие плазмиду pGV3850. Для этого используют две совместимые вспомогательные плазмиды, как правило, pJG28 и R64drdII, которые также совместимы с pBR322. Первая способствует мобилизации ColEI-подобных репликонов, а вторая — их конъюгационному переносу в клетки отдаленных видов. После конъюгации по

селективному маркеру (Km^R в нашем примере) отбирают клетки *A. tumefaciens* с перешедшими в них рекомбинантными промежуточными векторами. Ни одна из перешедших плазмид, включая вспомогательные, не способна к самостоятельной репликации в реципиенте. Поэтому отобранные клетки содержат только коинтеграцию плазмиды pGV3850 с рекомбинантным промежуточным вектором, образовавшийся путем рекомбинации по областям гомологии. Чужеродные гены переносятся затем в растительные клетки в составе рекомбинантной Т-ДНК, а трансформанты отбирают по второму селективному маркеру (*neo* в нашем примере).

Сходная идеология используется в коинтегративных векторах, основанных на использовании системы сайт-специфической рекомбинации *loxP*-Cre фага P1 (Mozo, Nooykaas, 1992).

Бинарные векторы более просты, более эффективны и потому более популярны. В бинарной системе Т-ДНК и *vir*-область находятся в агробактериях на разных совместимых плазмидах, и, тем не менее, такие агробактерии могут осуществлять трансформацию растений (Ноекта *et al.*, 1983). Векторы, несущие неонкогенную Т-ДНК, конструируют на базе плазмид с широким кругом хозяев, что позволяет манипулировать ими в клетках *E. coli* и *A. tumefaciens*. Например, широко используемый вектор pBin19

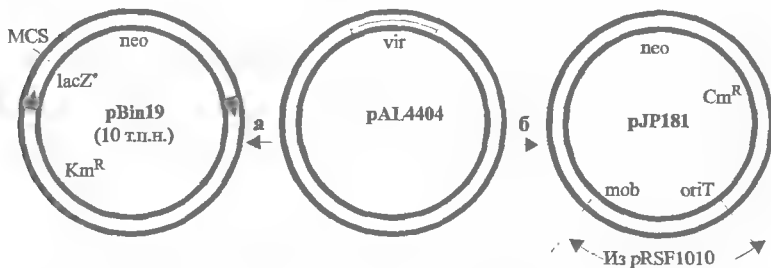


Рис. 12.3. Системы бинарных векторов с Т-ДНК (а) и без Т-ДНК (б). *vir*-Функция плазмиды-помощника pAL4404 обеспечивает перенос в растения модифицированной Т-ДНК вектора pBin19 (а) и всей плазмиды pJP181 (б).

Знаки ► в дуплексе обозначают прямые концевые повторы Т-ДНК; MCS — полилинкер плазмиды pUC19

поддерживается репликатором плазмиды pRK252 (группа несовместимости IncP). В его Т-ДНК внедрен фрагмент из плазмиды pUC19, включающий начальную часть гена *lacZ* с полилинкером, а под промотором гена *nos* находится селективный маркер *neo* (рис. 12.3,а). Операции по клонированию чужеродных генов и отбор рекомбинантных клонов по эффекту α -комплементации ведут в клетках *E. coli*. Рекомбинантный вектор переносят в *A. tumefaciens* трансформацией или конъюгацией с использованием вспомогательных плазмид и маркера *Km^R*. Плазмидо-помощник pAL4404, содержащая *vir*-область, способствует переносу рекомбинантной Т-ДНК из агробактерий в растения.

Бинарные векторы без Т-ДНК. В гл. 3 отмечалось сходство между механизмами конъюгации и переноса Т-ДНК в растительные клетки. Сходство оказалось настолько близким, что некоторые плазмиды могут переноситься с помощью своих систем мобилизации через каналы, образованные *vir*-системой Ti-плазмид. Впервые это было продемонстрировано на примере бинарных векторов pJP181 и pAL4404 (Buchanan-Wollaston *et al.*, 1987). Вектор pJP181 (рис. 12.3,б) сконструирован на базе репликона и *mob*-системы плазмиды RSF1010 (см. рис. 3.13,б). В присутствии плазмиды-помощника pAL4404 эта система успешно использована для переноса всей плазмиды pJP181 и содержащихся в ней чужеродных генов из бактерий *A. tumefaciens* в клетки табака. Плазмидная ДНК была обнаружена в хромосомах всех отобранных по признаку устойчивости к канамицину растительных трансформантов.

Ri-векторы. Уже говорилось (см. гл. 3), что способностью трансформировать клетки двудольных растений обладают также определенные Ri-плазмиды *A. risogenes*. Т-ДНК Ri-плазмид обнаруживается в нескольких копиях в хромосомах трансформированных клеток корешков. Эти клетки неонкогенны. Они синтезируют опиины, быстро растут в культуре и из них можно регенерировать здоровые плодовые растения. Поэтому Ri-плазмиды как природные неонкогенные векторы более привлекательны, чем Ti-плазмиды. На их основе были созданы интегративные и бинарные векторы.

Вирусные векторы не получили широкого распространения. Характерной чертой эукариотических вирусов является компактное строение их генома и практически полное отсутствие генов, несущественных для их развития. Поэтому клонирование с их помощью чужеродной ДНК вызывает их дефектность и требует использования вирусов-помощников.

Напомним, что среди вирусов растений “ДНКовые” составляют меньшинство. Ранее они рассматривались как средство доставки чужеродных генов в те растения, которые не подвержены инфицированию агробактериями. Однако по мере разработки новых методов трансформации растительных клеток (см. далее) необходимость в этом отпала. В настоящее время применение вирусных векторов ограничено, как правило, исследованиями в области вирусологии растений.

Определенный прогресс достигнут только с двумя группами “ДНКовых” вирусов — каулимовирусами (инфицируют двудольные растения) и геминивирусами (инфицируют одно- и двудольные растения). Серьезным недостатком векторов, сделанных на их основе, является ограничение по размеру упаковываемой в капсулу ДНК. Первая группа представлена вирусом мозаики цветной капусты (CaMV), имеющим кольцевую двунитевую ДНК длиной 8024 п.н. Из восьми генов только два несмежных несущественны для развития вируса. Их замена позволяет внедрять фрагменты ДНК размером всего лишь в несколько сотен пар нуклеотидов. Заражение этим вирусом является системным, т.е. вирусы распространяются по всему растению. В растительных экспрессионных векторах широко используют сильные промоторы вируса CaMV — S35-РНК и гена VI, которые на 1–2 порядка эффективнее, чем, например, промотор гена *nos*.

Геном геминивирусов представлен одной или двумя молекулами кольцевой однонитевой ДНК общей длиной 2,7 тыс. нуклеотидов. Изолированная вирусная ДНК, нативная или в двунитевой репликативной форме, не является инфекционной. Оказалось, однако, возможным ввести эту ДНК в растительные клетки с помощью агробактерий (Grimsley *et al.*, 1987). Тандемный димер вирусной ДНК был встроен в Т-ДНК и с помощью *A. tumefaciens* перенесен в кукурузу, у которой появились все

симптомы вирусного заболевания. Этот прием был назван агроинфекцией. Он интересен тем, что позволяет избежать ограничений по размеру рекомбинантной вирусной ДНК и оказался применимым к другим вирусам. Кроме того, в частности, этот эксперимент свидетельствует о возможности инфицирования агробактериями также и однодольных растений.

Потенциально векторами могут быть и кДНК РНК-овых вирусов, особенно у нитевидных, поскольку упомянутое ограничение здесь не так жестко. Проводятся эксперименты с вирусом табачной мозаики (TMV) и вирусом мозаики костра (BMV).

Трансформация растительных клеток

Трансформация агробактериями. В зависимости от цели экспериментов и степени изученности объекта возможны несколько способов трансформации растительных клеток агробактериями и регенерации из них целых растений. Простейший из способов предложен для модельных растений (Horsch *et al.*, 1985). Из молодых листьев готовят диски размером несколько миллиметров, стерилизуют их поверхность и инокулируют в жидкую среду, которая содержит агробактерии, несущие рекомбинантные векторы. При этом происходит инфицирование растительных клеток, находящихся на краях диска. После двух дней культивирования диски переносят на плотную среду с карбенициллином (убийство агробактерий), канамицином (отбор растительных клеток, приобретших ген *neo*) и высоким содержанием цитокинина (индукция образования побегов). На этой среде сначала в отдельных местах по краям диска происходит образование каллуса, из которого через 2–4 недели развиваются побеги (рис. 12.4, *a*). Затем каллус с побегом отделяют и переносят на среду с повышенным содержанием ауксина, индуцируя образование корней. Через дополнительные 2–4 недели растение переносят в почву.

При работе с новыми видами растений в предварительных опытах, используя онкогенные агробактерии, определяют, какие эксплантаты подходят для таких опытов. Ими могут быть сегменты листьев, стебля, клубня, корня, черешка, проро-

стка или размножаемые *in vitro* растения (рис. 12.4,б). Затем опыты повторяют с неонкогенными агробактериями. Далее каллус или нити косматого корня переносят на плотную питательную среду и, меняя состав сред и условия культивирования, добиваются регенерации растений по схеме, представленной на рис. 12.4,а.

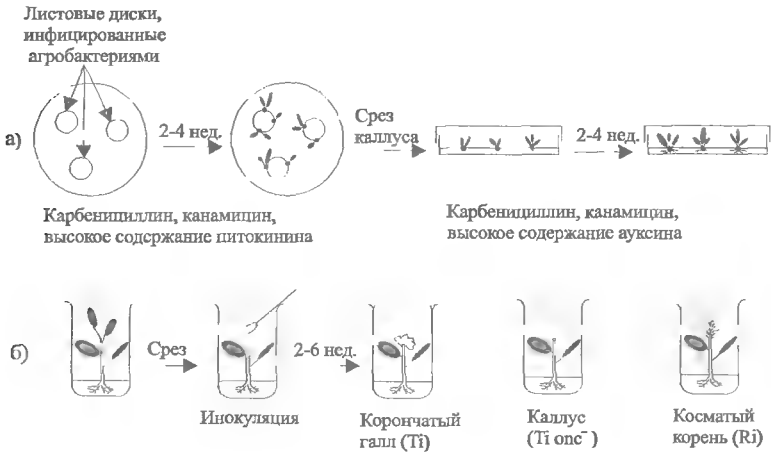


Рис. 12.4. Способы трансформации растительных клеток агробактериями и регенерации растений: трансформация листовых дисков (а) и трансформация среза растения (б)

Клон трансформированных растительных клеток получают исходя из их протопластов. Протопластирование является надежным методом получения изолированных растительных клеток. В подходящих условиях протопласт заново синтезирует клеточную стенку и вступает в митоз (см. рис. 5.4). Синтез ДНК служит сигналом о готовности растительной клетки к ее трансформации агробактериями. В этот момент, который наступает через неделю после начала культивирования протопластов в жидкой среде, к ним добавляют агробактерии. После 1–2 недель дополнительного культивирования образовавшиеся в суспензии микроколонии растительных клеток (они после деления не расходятся) высеваяют на плотную селективную

среду. Через 3–6 недель на чашках образуется каллус, из которого затем можно регенерировать целое растение. Именно такое растение будет трансгенным, если инфицирующие агробактерии содержали рекомбинантную Т-ДНК.

Метод переноса чужеродных генов в растения с помощью агробактерий не является универсальным. Основным недостатком является ограничение по кругу хозяев. Лишь в единичных случаях удавалось трансформировать однодольные растения агробактериями. Например, оказалось возможным индуцировать образование корончатого галла у батата *Dioscorea bulbifera* (однодольное растение), инфицированного клетками *A. tumefaciens*, у которых область *vir* была предварительно индуцирована ацетосирингонами пораненного картофеля (двудольное растение). Но проблема ограничения связана не только с однодольными. Для многих видов культурных двудольных тоже пока не найдены условия их трансформации и/или регенерации целых растений из изолированных клеток. В таких случаях для трансформации используют препараты изолированной ДНК.

Трансформация протопластов изолированной ДНК. Впервые достоверная возможность химической трансформации растений была показана в опытах с двудольными. Их протопласты обрабатывали в присутствии полиэтиленгликоля выделенными Ti-плазмидами. После регенерации стенки клетки стали опухолевыми, а ДНК обнаружилась в ядрах, причем Т-ДНК оставалась в составе Ti-плазмид (Krens *et al.*, 1982). Этот результат позволил приступить к созданию векторов, предназначенных для переноса генов в растения без использования агробактерий.

Структура таких векторов стандартна. Они содержат все необходимые элементы для манипулирования ими в клетках *E. coli*, маркер для селекции растительных трансформантов и полилинкер (рис. 12.5,а). Особенно важно отметить, что эти векторы можно использовать для трансформации протопластов как однодольных, так и двудольных растений. Их небольшой размер (несколько т.п.н.) позволяет достигать достаточно высокого уровня трансформации ($10^4 - 10^2$) при введении рекДНК в протопласты с помощью полиэтиленгликоля, липосом и методом электропорации. Апробирован также метод прямой микроинъекции рекДНК в ядра протопластов. Частоты трансформации при этом

столь велики (5–25 %), что отпадает необходимость в использовании селективных маркеров. Для защиты ДНК от потерь во время манипуляций в препарат иногда добавляют инертную ДНК-носитель.

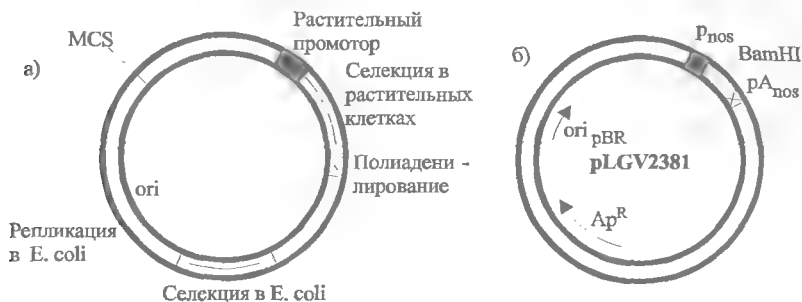


Рис. 12.5. Строение векторов, предназначенных для экспрессии генов в растительных клетках: а — принципиальная схема трансформирующего вектора; б — коинтегративный экспрессионный вектор pLGV2381.

MCS — полилинкер; рА — сайт полиаденилирования

Однако и метод трансформации протопластов изолированной ДНК имеет свои ограничения. Далеко не у всех видов растений удастся добиться регенерации клеток из протопластов, а у многих культурных видов регенерировавшие клетки не являются тотипотентными, поэтому из них нельзя восстановить растение.

Трансформация клеток и тканей изолированной ДНК. Растительные клетки имеют прочную стенку, и пока единственным универсальным способом ее преодоления является обстрел растительных тканей ускоренными микрочастицами вольфрама, выдержанными в растворе векторной ДНК или РНК (Klein *et al.*, 1987). Этот метод успешно применялся к различным типам клеток и разным тканям однодольных и двудольных растений. Достигнута и стабильная трансформация хлоропластов.

Основной недостаток методов трансформации с использованием изолированной ДНК — это непредсказуемый характер ее интеграции в клеточный геном. Разрывы, перекомбинации фрагментов и конкатемеризация трансформирующей ДНК происходят гораздо чаще, чем при трансформации агробактериями.

Экспрессия чужеродных генов

Какие гены воспринимаются растениями как чужеродные? Конечно, те из них, регуляторные сигналы которых (промоторы, сайты сплайсинга и полиаденилирования) они не узнают. Это гены бактерий, грибов и животных. Растительные гены, как правило, точно транскрибируются и сплайсируются при гетерологичных переносах, но существуют достаточно серьезные барьеры между однодольными и двудольными растениями. Например, промотор гена *rbcS* (см. с. 386) пшеницы не функционирует в трансгенном табаке. Замена его вирусным промотором CaMV 35S обеспечила транскрипцию этого гена, но сплайсинг и полиаденилирование были некорректными. Использование кДНК вместо геномных генов устраняет только проблему сплайсинга.

Элементы гена *nos* в качестве экспрессионной кассеты были использованы уже в первом коинтегративном векторе pLGV2381, предназначенном для экспрессии клонированных генов (рис. 12.5,б). В нем тандемом расположены начальная часть гена *nos* с промотором и 5'-нетранслируемой последовательностью, а также его 3'-концевая часть, содержащая сайт полиаденилирования мРНК (Herrera-Estrella *et al.*, 1983). Обе части разделяются в плазмиде единственным сайтом *Bam*HI, который и был использован для внедрения в плазмиду чужеродных генов. Прежде всего в него внедрили ген *ocs* октопиновой плазмиды и перенесли в клетки *A. tumefaciens*, содержащую плазмиду pTiC58. Образовавшиеся коинтеграаты (как это представлено на рис. 12.2) индуцировали в инфицированных растениях формирование корончатых галлов, которые синтезировали нопалин и октопин. На следующем этапе с помощью того же вектора впервые удалось осуществить экспрессию чужеродного гена (*cat*) в растениях. В дальнейшем он же был использован для создания селективных маркеров для растений (*nrpI*, *nrpII*, *dhfr*).

В зависимости от цели экспериментов экспрессия чужеродных генов может изучаться на уровне клеток или целого растения. Исследования на клеточном уровне часто проводят только для тестирования создаваемых векторных конструкций,

когда необходимо просто определить, есть ли экспрессия клонируемого гена и какова ее эффективность. В таких случаях после трансформации клеток ограничиваются детектированием кратковременной (transient) экспрессии гена, не добиваясь получения стабильных трансформантов, у которых рекДНК интегрирована в клеточный геном.

На уровне целого организма при получении трансгенных растений возникает проблема тканеспецифической регуляции экспрессии клонированных генов. Известно, что тканеспецифичность экспрессии определяется набором регуляторных сайтов в предпромоторной области гена, с которыми взаимодействуют транскрипционные факторы, а также энхансерами и сайленсерами, расположенными по обе стороны гена. Такие сигналы сохраняют свою функциональность при межвидовых переносах. К примеру, ген фазеолина (запасной белок) фасоли со своим 5'-концевым участком размером около 1 т.п.н. был перенесен с помощью Ti-плазмиды в табак. В трансгенном растении этот ген экспрессировался только в семенах и только в стадии молочной спелости, т. е. точно там и тогда, где этот ген транскрибируется в самой фасоли (Sengupta-Gopalan *et al.*, 1985).

Регуляторные сайты идентифицируют с помощью присоединяемых к ним генов-репортеров. Так называют гены, чьи продукты определяются с помощью простых и чувствительных методов (колориметрия, флюорометрия, люминометрия, радиометрия) и чья активность в растительных клетках в норме отсутствует. К таким генам относятся *nos* и *ocs*, но чаще других используют уже упоминавшиеся селективные гены *cat* и *neo*, а также ген *E. coli udiA* (он же *GUS*), кодирующий β-глюкуронидазу. Этот фермент катализирует расщепление широкого ряда β-глюкуронидов, многие из которых являются хромогенными субстратами, что позволяет проводить чувствительные количественные тесты *in vitro*, *in vivo* и *in situ* (гистохимически). Изучаемую регуляторную область соединяют с геном-репортером путем транскрипционного или трансляционного слияния (рис. 12.6). В первом варианте образуется индивидуальный фермент, во втором — гибридный, причем лишние аминокислоты не мешают проявлению репортерной функции.

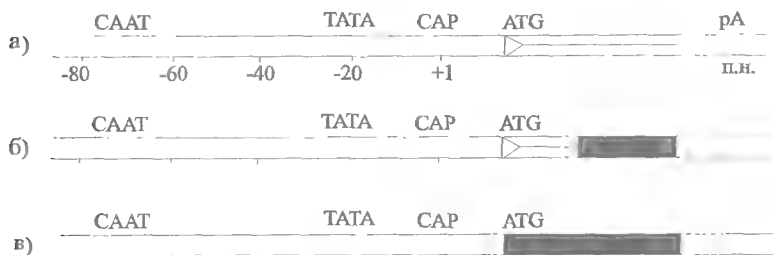


Рис. 12.6. Схемы присоединения гена-репортера к регуляторной области исследуемого растительного гена: *а* — регуляторная область растительного гена; *б* — трансляционное слияние; *в* — транскрипционное слияние.

СААТ и ТАТА — консервативные последовательности промотора; САР — область начала транскрипции, кодирование экзона; рА — сайт полиаденилирования. Черным цветом выделена последовательность гена-репортера

С помощью такого подхода были исследованы регуляторные области ядерных генов *rbcs* (кодирует малую субъединицу рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы) и *cab* (кодирует хлорофилл *a/b* связывающий белок). (Отметим для корректности, что оба гена принадлежат разным мультигенным семействам.) Оба белка после синтеза транспортируются в хлоропласт, где входят в состав светособирающего комплекса тилакоидных мембран и участвуют в фотосинтезе. Поэтому экспрессия их генов органоспецифична и индуцируется светом через посредство фитохромов (белки-фоторецепторы). Для выявления структуры регуляторных областей их делеционные варианты присоединяли к генам-репортерам *cat* или *neo* и исследовали их экспрессию в разных органах трансгенных растений петунии или табака (сами гены были взяты из гороха). Было выяснено, что, например, чувствительность гена *rbcs* к свету определяется только ТАТА-боксом (первые 33 п.н. промотора), а тканеспецифичность зависит от участка с координатами приблизительно от -1050 до -350 (Broglie *et al.*, 1984). В этом участке найдены энхансеры и сайленсеры. Наибольшая активность белка-репортера обнаруживается в листьях, меньшая — в стебле, отсутствует в корнях.

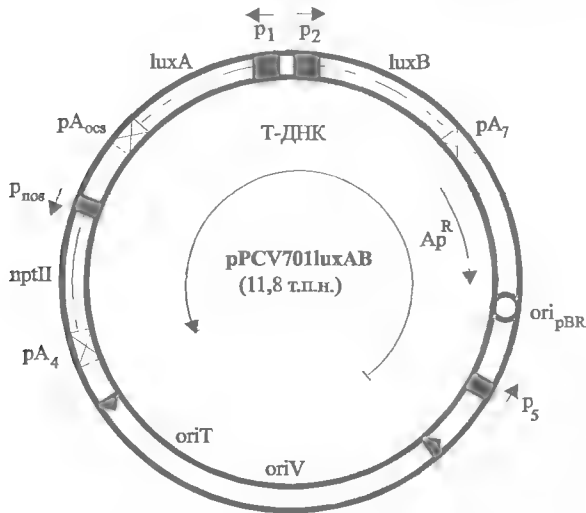


Рис. 12.7. Схема бинарного вектора pPCV701, предназначенного для экспрессии бактериальных генов *luxA* и *luxB*.

p_1 и p_2 — промоторы генов 1' и 2' T_R -ДНК; p_{nos} и p_5 — промоторы генов *nos* и 5 T_1 -ДНК; pA_4 , pA_7 и pA_{ocs} — сайты полиаденилирования генов 4, 7 и *ocs*; *oriT* и *oriV* — сайты начала репликации и конъюгационного переноса плазмиды pRK2. Стрелки показывают направление транскрипции. Знаки ► в дуплексе обозначают прямые концевые повторы Т-ДНК

В качестве репортерных применяются и гены *lux* бактерий *Vibrio harveyi* и светлячка *Photinus pyralis*, кодирующие люциферазу (см. гл. 7). У бактерий люциферазная активность обеспечивается двумя генами, входящими в один оперон, но с целью экспрессии в растительных клетках в бинарном векторе pPCV701 (рис. 12.7) *luxA* и *luxB* поставили под разные промоторы, промоторы p_1 и p_2 генов 1' и 2' T_R -ДНК (см. рис. 12.1). Оба гена находятся в пределах прямых концевых повторов одной и той же Т-ДНК, что необходимо для их одновременного введения в одну

и ту же клетку. Кроме генов *lux* в Т-ДНК внедрены селективные маркеры для растений (*nrpII*) и *E. coli* (*Ap^R*). Поддержание вектора в клетках *A. tumefaciens* осуществляется репликатором плазмиды pRK2, помещенным вне Т-ДНК. Рекомбинантный вектор вводили в растительные клетки или протопласты табака и моркови либо с помощью агробактерий, либо трансформацией изолированной ДНК. Во всех случаях трансгенные растения экспрессировали гены *lux* (Koncz *et al.*, 1987), что свидетельствовало об их способности точно собирать гетеродимерный комплекс бактериальных белков.

Интересно отметить, что чужеродные белки могут выполнять в растительных клетках и регуляторную роль, если их мишень внедрить в надлежащий локус (например, оператор для связывания репрессора поместить в промотор регулируемого гена).

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОВТОРЕНИЯ И ОБСУЖДЕНИЯ

12.1. В чем состоит особенность генетики Т-ДНК?

12.2. На чем основана идея коинтегративных растительных векторов?

12.3. Какие бактериальные селективные маркеры и гены-репортеры используют в растительных векторах?

12.4. В чем преимущество бинарных растительных векторов по сравнению с коинтегративными?

12.5. Почему оказалось возможным использовать бинарные векторы, не содержащие Т-ДНК?

12.6. Для каких целей и каким образом используется агроинфекция?

12.7. Какие подходы используют для трансформации клеток однодольных растений?

12.8. Опишите основные этапы получения трансгенных растений. Как будет проявляться эффект тканеспецифичности экспрессии чужеродного гена? Будет ли этот эффект одинаковым в независимо полученных трансгенных растениях?

12.9. Как отыскивают и исследуют регуляторные области растительных генов?

12.10. Зная строение вектора pBin19 (рис. 12.3,а), составьте план эксперимента по переносу генов *lux* в клетки табака. Как убедиться, что перенос прошел успешно?

Глава 13

ЖИВОТНЫЕ

В результате многочисленных опытов по клонированию генов животных в бактериальных клетках были достигнуты существенные успехи в расшифровке их строения. Однако их функции и ряд механизмов регулирования тканеспецифической экспрессии генов можно исследовать только в животных клетках. Поэтому уже с первых шагов генетическая инженерия клеток животных развивалась с ориентацией на экспрессию клонируемых генов. Были сконструированы подходящие для такой цели векторы, разработаны методы трансформации клеток животных и способы введения отдельных генов в геномы многоклеточных организмов.

Своеобразие внутриклеточных процессов реализации генетической информации у животных позволяет наблюдать эффект введения чужДНК не только в случае ее стабильного поддержания в клетке, но и как временную экспрессию до момента ее деградации. Это означает, что многие вопросы при наличии генов-репортеров можно решать, используя векторы, которые имеют только бактериальные репликаторы.

В практическом плане первоочередной задачей генетической инженерии животных клеток (и в первую очередь клеток млекопитающих) является изучение генов человека с целью использования полученных знаний в медицине. Введение клонируемых генов в зародышевые клетки и получение трансгенных животных даст возможность изучать механизмы, регулирующие экспрессию генов в процессе онтогенеза. Не менее важна технология введения генов в соматические клетки. Работы в этом направлении можно охарактеризовать как поиск путей генной терапии, т. е. замены мутантных генов их нормальными аллелями. Решение данной проблемы особенно важно, поскольку уже известно около

5000 наследственных заболеваний человека, и во многих случаях только введение “здорового” гена может привести к устранению генетического дефекта.

Другой практически важной проблемой является конструирование продуцентов лекарственных препаратов полипептидного строения. Дело в том, что многие животные белки при их синтезе в бактериальных или дрожжевых клетках неправильно модифицируются и/или приобретают измененную пространственную структуру, в связи с чем проявляют слабую активность либо вообще неактивны. Например, бактерии не могут осуществлять такие посттрансляционные модификации эукариотических белков, как гликозилирование, фосфорилирование, точное образование дисульфидных связей, специфический протеолиз, олигомеризацию и т. п.

ТРАНСФОРМАЦИЯ КЛЕТОК

Генно-инженерные методы в применении к животным клеткам свели вместе два разных смысла термина “трансформация”: введение в клетку изолированной ДНК с различными для клетки последствиями и перерождение клетки из нормальной в онкогенную. Во втором его смысле в рамках данной главы будем применять термин “онкотрансформация”. Онкотрансформацию вызывает ряд вирусов при инфицировании или трансфекции ими клеток (в частности, широко используемый в генно-инженерной практике вирус SV40).

Культивируемые клетки. Для характеристики трансформирующей ДНК используют стандартные клеточные культуры — человеческие клетки HeLa (рак шейки матки, эпителиальный тип), фибробласты мышей 3Т3 или 3Т6 или же клетки печени мыши (L-клетки). При выборе новых экспериментальных моделей крайне важно подобрать условия культивирования клеток. Клетки, растущие в монослое, более подходящий объект для трансформации, чем клетки, культивируемые в суспензии. Для выделения клеток из монослоев применяют трипсин.

Селективные маркеры и гены-репортеры. В гл. 5 уже отмечалась ограниченность спектра селективных маркеров, используемых для отбора трансформированных животных клеток. Это,

во-первых, гены, продукты которых осуществляют метаболизм азотистых оснований — гены гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (*HGPRT*), аденинфосфорибозилтрансферазы (*APRT*) и тимидинкиназы (*TK*). Реципиентами в этом случае могут служить только мутантные клетки. Во-вторых, это более 20 генов, обеспечивающих селекцию в случае их мультипликации. Наиболее известен ген дигидрофолатредуктазы (*dhfr*). В-третьих, это гены бактериального происхождения *gpt* и *neo* (см. гл. 5), поставленные под вирусный промотор. Напомним, что ген *neo* придает клеткам устойчивость к антибиотику G418 и используется как селективный маркер также при работе с клетками дрожжей и растений. Удобство двух последних групп маркеров в том, что они позволяют работать с немутантными клетками.

Гены-репортеры благодаря простоте определения их экспрессии широко используются для исследовательских целей. Для работы с клетками животных удобны уже упоминавшиеся в гл. 12 гены *cat* и *lux*, а также ген *lacZ*.

Кальций-фосфатный метод. Этот метод трансформации клеток животных изолированной ДНК был впервые использован еще в “эпоху” до генной инженерии (Szybalska, Szybalski, 1962). Клетки *HGPRT*⁻ человека были трансформированы препаратом ДНК человека, выделенным из клеток дикого типа, а редкие *HGPRT*⁺-трансформанты были отобраны на среде НАТ (см. гл. 5). Метод оказался применимым и для трансфекции клеток вирусной ДНК (Graham, van der Eb, 1973), причем в лучших вариантах до 20 % обработанных клеток поглощают ДНК (Chu, Sharp, 1981).

Трансформирующая ДНК должна иметь селективный маркер, причем ДНК, содержащая селективный ген, может быть физически не связана с исследуемой ДНК (Wigler *et al.*, 1979). При оптимальном соотношении концентраций кальция (125 мМ) и ДНК (5–30 мкг/мл) их соосаждение фосфатом при pH7 происходит за 20–30 мин. Если концентрация исследуемой ДНК невелика, то ее общее содержание доводят до рекомендуемой величины добавлением любой дешевой инертной ДНК (ДНК-носителя). Полученную суспензию наносят поверх монослоя клеток или вносят в нее клетки, культивируемые в жидкой среде. В течение 16–24 ч при 37 °С в атмосфере 5–7 % CO₂ гранулы осадка путем

эндоцитоза поглощаются клеткой, после чего суспензию удаляют отмыванием и клетки дополнительно культивируют 50–60 ч. За это время трансформирующая ДНК локализуется в клеточном ядре в виде высокомолекулярных соединений, в которых ковалентно связаны в различных комбинациях исследуемые и селективные гены с фрагментами ДНК-носителя. Такие молекулы называют трансгеномами. Трансформант может содержать несколько различных трансгеномов размером до миллиона пар нуклеотидов. Трансгеномы вначале существуют отдельно от клеточных хромосом, обуславливая тем самым нестабильность трансформантов. Гены трансгеномов могут кратковременно экспрессироваться, что может быть зафиксировано по появлению специфических РНК или белков (см. приложение).

Иногда один из трансгеномов интегрируется в клеточный геном, образуя достаточно стабильные трансформанты (селективный маркер теряется с частотой около 10^{-4} на генерацию). Такие трансформанты выявляют путем посева обработанных трипсином клеток на селективные среды (около 10^7 клеток на чашку). Через 2–3 недели на чашках появляются колонии трансформантов. Среди них более половины приходится на клетки, несущие одновременно с селективным геном неселективный (исследуемый).

В стабильных трансформантах, полученных после обработки клеток чистыми плазмидами (без ДНК-носителя), плазмидная ДНК обнаруживается в клеточном геноме обычно в единичных копиях в нескольких различных сайтах. Линеаризация плазмид рестриктазами увеличивает вероятность их интеграции и конкатемеризации, поскольку линейные ДНК являются лучшими субстратами для ферментов, ведущих рекомбинацию.

ДЕАЕ-декстрановый метод. Присутствие поликатиона диэтиламиноэтил-декстрана в среде (около 1 ч при концентрации 1 мг/мл или около 8 ч при концентрации 0,25 мг/мл) способствует каким-то образом эндоцитозу ДНК животной клеткой. Метод отличается от предыдущего тремя важными аспектами. Во-первых, его применяют только для временной экспрессии клонированных генов (стабильной трансформации достичь не удастся). Во-вторых, для трансформации используют только небольшие количества ДНК (несколько сотен нанограммов), так как большие ко-

личества (более 2–3 мкг) ее ингибируют. В-третьих, метод эффективен лишь для небольшого круга клеточных линий, для большинства клеток полимер токсичен.

Микроинъекция ДНК в ядра (Saracchi, 1980). Микроинъекцию осуществляют под микроскопом с помощью микрокапиллярной пипетки (внешний диаметр около 1 мкм, внутренний около 0,5 мкм). Вводимый раствор содержит 10^2 – 10^4 молекул трансформирующей ДНК. Объем его не превышает нескольких пиколитров.

Высокая частота получения стабильных трансформантов, достигаемая при микроинъекции ДНК в ядра животных клеток (около 20 %), позволяет использовать данный метод даже для случаев, когда в трансформирующей ДНК нет селективных маркеров. В опытах по совместной микроинъекции двух плазмид pBR322 с разными вставками было показано, что котрансформирующие плазмиды образуют в клетке мультимерные трансгеномы, которые интегрируются в клеточные хромосомы (Andersen *et al.*, 1980).

Отметим кстати, что эффективность метода микроинъекции была впервые продемонстрирована на ооцитах лягушки, которые экспрессировали введенную в них мРНК глобина кролика (Gurdon *et al.*, 1971). Ооциты лягушки являются простейшей системой, позволяющей в предварительных экспериментах тестировать мРНК и ДНК растений и животных на их способность к экспрессии.

Электропорация. Короткий высоковольтный импульс, приложенный к клеткам животных, вызывает в их мембранах образование пор нанометрового размера (Neumann *et al.*, 1982). Если в суспензии клеток, находящихся в солевом буфере, присутствует ДНК в концентрации 1–40 мкг/мл, то она оказывается внутри клеток. Этому способствует, по-видимому, каким-то образом движение слоев мембраны при “затягивании” пор. Метод эффективен и для опытов по кратковременной экспрессии клонированных генов и для получения стабильных трансформантов. Условия эффективной электропорации различны для разных линий клеток, поэтому их следует подбирать в предварительных экспериментах. В среднем величина электрического поля — 250–750 В/см,

длительность импульса равняется 20–100 мс. В этих условиях выживает 20–50 % популяции клеток.

Слияние протопластов. Метод используют для непосредственного переноса плазмид из бактерий в клетки животных (Schaffner, 1980). В присутствии полиэтиленгликоля бактериальные протопласты наносят поверх монослоя клеток или смешивают с клетками, культивируемыми в жидкой среде. После слияния протопластов с животными клетками через 40–60 ч при 37 °C плазмиды оказываются в ядре клеток. Метод эффективен и для опытов по временной экспрессии клонированных генов, и для получения стабильных трансформантов. При соотношении бактериальных протопластов к животным клеткам как 10000:1 временная экспрессия наблюдается в 100 % клеток, а выход стабильных трансформантов достигает 10^{-4} .

Сходные операции осуществляют при слиянии липосом, содержащих ДНК или РНК, с животными клетками. Таким путем удалось ввести в раковые клетки простаты человека рекДНК, экспрессирующую человеческий ген интерлейкина-2 (Vieweg *et al.*, 1994).

ВЕКТОРЫ

Вирусные векторы

Ядерные плазмиды у высших эукариот пока не описаны, поэтому естественными кандидатами на роль “доноров” своих репликаторов для конструируемых векторов животных являются вирусы. Хотя сами вирусы обладают эффективным природным способом вводить свою ДНК (РНК) в клетку и реплицировать ее в большом числе копий, но в исследовательских целях из-за ряда недостатков вирусные векторы используют реже, чем плазмидные. Во-первых, в геноме большинства изученных вирусов отсутствуют несущественные для их развития области, которые можно было бы заменить клонируемой ДНК. Поэтому векторы, сконструированные на базе таких вирусов, дефектны. Вследствие этого для работы с ними нужны вирусы-помощники или специальные клетки-хозяева, содержащие в геноме необходимую для вируса дополнительную информацию. Во-вторых, емкость вирусных векторов ограничена, так как в вирусный капсид может

упаковаться лишь определенное количество ДНК (РНК). Это весьма серьезное препятствие для клонирования эукариотических генов, так как многие среди них состоят из нескольких десятков тысяч пар нуклеотидов. В-третьих, вирусные векторы реплицируются только в животных клетках, что крайне осложняет конструирование рекДНК, поскольку эти клетки трудно культивируются и медленно размножаются.

Особенности вирусных векторов, используемых для генной терапии человека, описаны отдельно (см. с. 422).

Первые векторы конструировали на базе ДНК опухолеродных вирусов, так как они обладают природным селективным свойством: трансформированные ими клетки заметно отличаются от нормальных. Часто такие вирусы развиваются литически в клетках одного типа, а онкотрансформации подвергают другие линии клеток. К ним относится вирус SV40.

Вирус SV40. В исследованиях по молекулярной генетике животных этот вирус играет такую же роль, как и фаг λ в бактериальной генетике: он является одновременно и моделью, и средством для анализа геномов животных. Эта аналогия тем более справедлива, что ДНК обоих вирусов широко используется в качестве векторов в генетической инженерии.

Вирус SV40 развивается в клетках обезьяны, образуя 10^4 – 10^5 частиц на клетку, и клетки при этом гибнут. В то же время при инфицировании перевиваемых клеток некоторых грызунов (мышей, крыс, хомячков и т.п.) развитие этого вируса блокируется на стадии репликации его ДНК. В результате вирусная ДНК интегрируется в хозяйскую ДНК, вызывая геномные перестройки и клеточную онкотрансформацию (бесконтрольное деление клеток). Отметим сразу, что по этой причине векторы, сконструированные на базе SV40 ДНК, редко используют для интеграции клонируемых генов в клеточные хромосомы, так как при этом нет уверенности в сохранении структуры этих генов. С помощью таких векторов наблюдают их временную экспрессию.

Двунитевая кольцевая ДНК этого вируса содержит 5243 п.н. (рис. 13.1). Отсчет нуклеотидов ведут по часовой стрелке от единственного *Bgl*I-сайта, расположенного в *ori*-сайте. Слева от *ori*-сайта находится ранний ген *A*, кодирующий два белка

(Т- и t-антигены). Эти белки необходимы для репликации вирусной ДНК. Справа от *ori*-сайта располагаются три перекрывающихся поздних гена, содержащих информацию о синтезе структурных белков VP1, VP2 и VP3. Ранний и поздние гены транскрибируются с одного двунаправленного промотора, локализованного рядом с *ori*-сайтом. Он включает в себя три tandemных GC-богатых повтора, содержащих по 21 п.н., участок, богатый АТ-парами (ТАТА-участок), и два tandemных повтора по 72 п.н. Последние являются энхансером одновременно для ранней и поздней транскрипции.

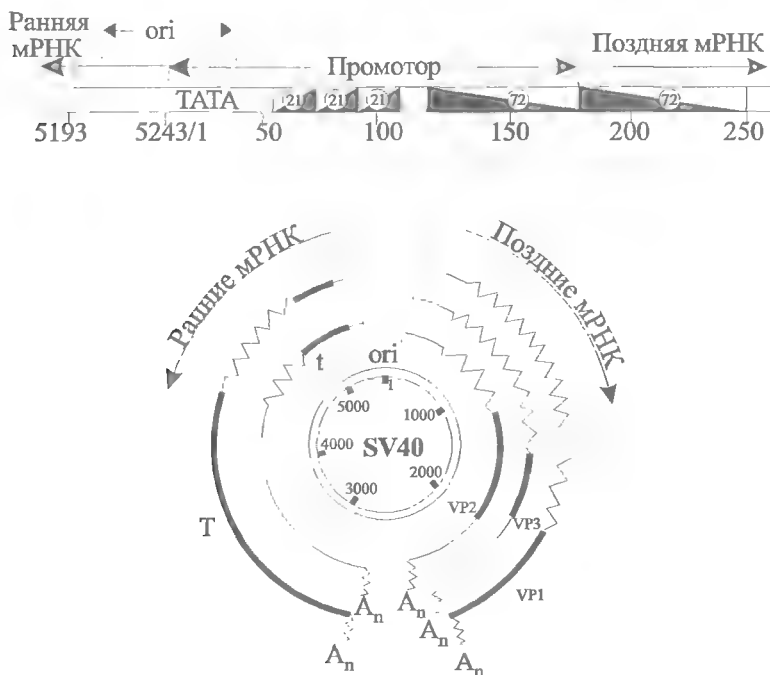


Рис. 13.1. Схема транскрипции ДНК вируса SV40 и строение ее промоторной области.

Координаты на генетической карте и в области промотора указаны в п.н., A_n — полиадениловая последовательность; волнистыми линиями показаны участки первичных транскриптов, удаляемые при сплайсинге; цифры в кружках обозначают число пар нуклеотидов в повторах

Ранний первичный транскрипт подвергается альтернативному сплайсингу, приводящему к образованию двух типов мРНК, которые обеспечивают синтез Т- и t-антигенов. На N-концах обоих белков располагаются одинаковые последовательности, состоящие из 82 аминокислот, а последующие аминокислотные последовательности в белках различны. Белок Т-антиген играет двойную роль. Его посадка на *ori*-сайт инициирует репликацию SV40 ДНК, а при достижении определенной концентрации он связывается с ближайшим к *ori*-сайту повтором из 21 п.н. и блокирует раннюю транскрипцию.

Поздний первичный транскрипт также подвергается альтернативному сплайсингу, образуя мРНК трех типов — 16S, 18S и 19S, которые определяют синтез белков VP1, VP3 и VP2, соответственно.

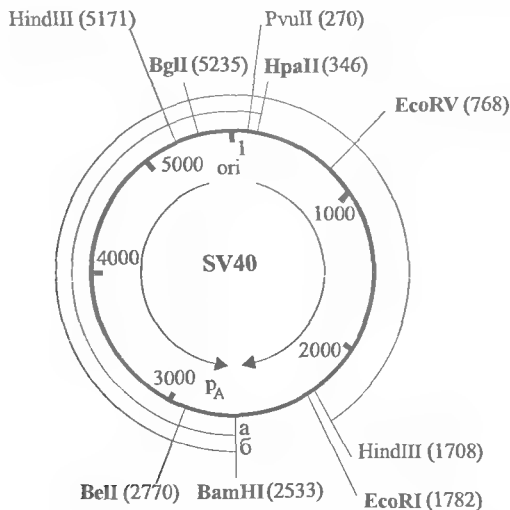


Рис. 13.2. Физическая карта SV40 ДНК и строение вирусных векторов SVGT1(*a*) и SVGT5(*b*)

Жирным шрифтом выделены единственные сайты рестрикции; координаты указаны в п.н.; стрелками показаны ранний (левосторонний) и поздний (правосторонний) транскрипты. pA — сайт полиаденилирования

Для конструирования первых векторов использовали рестриктазы и сайты рестрикции, приведенные на физической карте SV40 ДНК (рис. 13.2).

Векторы с замещением поздних генов SV40 ДНК. Первые попытки конструирования вирусных векторов были осуществлены с вирусом SV40, в ДНК которого нет протяженных спейсеров. В вирусном геноме замещали на чужДНК поздние или ранние гены. Полученные конструкции являлись векторами замещения с емкостью не более 2,5 т.п.н., причем для работы с ними требовался вирус-помощник.

Вектор SVGT1 (рис. 13.2, а) был получен путем удаления из вирусной ДНК поздних генов с помощью единственных сайтов *HpaII* и *BamHI* (Goff, Berg, 1976). С использованием АТ-коннектора в него был встроен подходящий по размеру фрагмент ДНК фага λ . Образовавшаяся рекДНК была введена в клетки трансфекцией совместно с ДНК вируса-помощника SV40 tsA , имеющего термочувствительную мутацию в репликационном гене *A*. В результате при 41 °С развиваются оба вируса, так как в клетках имеются кодируемые вектором ранние и кодируемые фагом-помощником поздние вирусные белки. Вирус, содержащий рекДНК, можно выделить и использовать для дальнейших манипуляций. Однако этот вектор оказался непригодным для экспрессии клонируемых генов, так как синтезированные мРНК были крайне нестабильны.

Причина неудачи была выяснена после изучения свойств вектора SVGT5 (рис. 13.2, б). Он был получен путем удаления из области поздних генов SV40 ДНК *HindIII*-*BamHI*-фрагмента, содержащего кодирующую часть белка VP1. В векторе сохранились поздний промотор, а также сигналы сплайсинга и полиаденилирования для 16S мРНК (*HindIII*-сайт располагается в 50 п.н. после интрона, а *BamHI*-сайт — в 50 п.н. до терминирующего кодона). Авторы (Mulligan *et al.*, 1979) клонировали в векторе SVGT5 кДНК и геномный ген β -глобина кролика. В обоих случаях происходили созревание мРНК и синтез белка, неотличимого от природного β -глобина. При клонировании геномного гена оказалось, что синтез мРНК может инициироваться и терминироваться на соответствующих вирусных или геномных сайтах и что при этом на обеих мРНК идет синтез белка. Было также обнаружено, что

для образования стабильной зрелой мРНК необходимо присутствие интрона либо в лидерном участке пре-мРНК, происходящем из вирусной ДНК, либо в гене глобина. Причина этого пока не выяснена. Известно только, что одни клонированные мозаичные гены могут, а другие не способны эффективно экспрессироваться в животных клетках, если у них удалены интроны.

В этой работе фактически впервые в эукариотическом векторе была сконструирована экспрессионная кассета и получены важные результаты, которые с тех пор учитываются при конструировании векторов, предназначенных для экспрессии чужеродных генов в животных клетках.

Экспрессионная кассета. Базовыми элементами эукариотической экспрессионной кассеты (транскрипционного модуля) являются промотор и сайт полиаденилирования, в котором формируется 3'-конец транскрипта. Напомним, что он определяет участок, где происходит отщепление "хвоста" транскрипта и его полиаденилирование (см. гл. 1). Дополнительными элементами кассеты служат энхансеры и интроны.

В отличие от сигналов процессинга мРНК, которые функционируют эффективно во всех типах клеток животных, детальное строение промоторов и энхансеров значительно варьирует у разных генов. Многие энхансеры активны только в определенных тканях или действуют только в присутствии определенных факторов (см. гл. 1). Эти обстоятельства следует учитывать при выборе или конструировании векторов. Наиболее универсальны вирусные энхансеры, из которых широко используются энхансеры вирусов SV40 и саркомы Рауса (RSV). Сигналы сплайсинга хотя и универсальны, но не безразличны к прилегающим к ним экзонным последовательностям. В случае конструирования рекДНК, в транскрипте которой будут соединены не взаимодействующие в норме сигналы сплайсинга, сплайсирование может быть неточным.

Апробирование различных эукариотических экспрессионных кассет было проведено путем их конструирования в составе плазмиды pBR322 и последующим наблюдением временной экспрессии после трансформации клеток.

Для достижения высокого уровня экспрессии чужеродных генов в животных клетках следует учитывать некоторые правила (Kozak, 1984; 1986):

вторичная структура в 5'-нетранслируемой области мРНК препятствует эффективной трансляции;

кодон AUG в 5'-нетранслируемой области мРНК мешает правильному иницирующему кодону;

консенсусом около иницирующего кодона у высших эукариот является последовательность CC(A/G)CCAUGG.

Отмечено, кроме того, что присутствие AU-богатой области в 3'-нетранслируемой области мРНК уменьшает ее стабильность (Shaw, Kamen, 1986).

Векторы с замещением ранней области SV40 ДНК. Конструирование векторов с делецией части гена *A* (дефектность по Т-функции) стало возможным после создания линии COS-клеток (производная от линии почечных клеток обезьяны CV-1). В хромосоме этих клеток содержится ген *A* вируса SV40 (Gluzman, 1981). Введение в COS-клетки векторов и рекДНК такого типа ведет к нормальному литическому циклу, т.е. не требует привлечения вирус-помощников. Экспрессионной кассетой служат ранний промотор и сайт полиаденилирования, а также малый t-интрон.

В процессе работы с таким типом векторов выяснилось, что COS-клетки поддерживают репликацию кольцевой ДНК, содержащей *ori*-сайт вируса SV40, вне зависимости от ее размера. Этот вывод стал отправным для создания плазмидных векторов.

Вирус осповакцины. Этот вирус обладает двунитевой ДНК, отличающейся уникальным строением. Она представляет собой линейную молекулу, на обоих концах которой имеется шпилька, замыкающая ковалентно обе нити ДНК (см. для примера рис.3.1,в). Транскрипция и репликация ДНК происходят в цитоплазме, поскольку вирус обладает всей нужной для этого информацией, а ряд необходимых белков содержится в самом вирионе.

Вирус осповакцины привлекателен в качестве вектора по нескольким причинам. Во-первых, у него широкий спектр клеток-хозяев (от позвоночных до беспозвоночных). Во-вторых, его большой геном (187 т.п.н.) позволяет внедрять фрагменты чужДНК размером до 25 т.п.н. В-третьих, его безопасность подтверждена

двухвековой практикой использования для вакцинации людей против вируса оспы. Техника вакцинации проста и рассчитана на применение в массовом масштабе. Поэтому было предложено вводить в геном вируса осповакцины гены, кодирующие белки-антигены различных болезнетворных вирусов (микробов), и использовать образующиеся рекомбинантные вирусы для вакцинации людей и создания у них иммунитета к другим (наряду с оспой) инфекционным заболеваниям.

Впервые эта идея была использована для клонирования и экспрессии в ДНК вируса осповакцины гена поверхностного антигена HBsAg вируса гепатита В (Smith *et al.*, 1983a). Большая величина вирусного генома затрудняла конструирование рекДНК *in vitro*. Поэтому сначала была создана вспомогательная плазида, в которой чужеродная вставка была фланкирована частями вирусного гена тимидинкиназы (ТК) и которая затем была встроена в вирусную ДНК *in vivo* через этот ген (рис. 13.3). Конструирование плазмиды было выполнено с помощью одного из плазмидных векторов *E. coli*, содержащего ген ТК вируса осповакцины. В этот ген был встроен промотор ранних генов вируса осповакцины, к которому присоединили ген HBsAg. Полученной таким образом рекомбинантной плазмидой трансформировали клетки обезьяны, инфицированные одновременно вирусом осповакцины. В ряде клеток произошла рекомбинация между вирусной и плазмидной ДНК по области гомологии в гене ТК. Рекомбинантные вирусы осповакцины, ставшие мутантными по тимидинкиназе, отбирали по фенотипу негативных колоний на клетках ТК⁻ в присутствии 5-бром-дезоксисуридина (BUdR, аналог тимидина). Такие вирусы синтезировали продукт гена HBsAg. После вакцинации кроликов рекомбинантным вирусом в их крови появились антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В. Успешно были вакцинированы и шимпанзе (Moss *et al.*, 1984).

Аналогичным образом были сконструированы рекомбинантные вирусы осповакцины, придающие хомякам устойчивость к заболеванию гриппом (Smith *et al.*, 1983b), а лисам — к заболеванию бешенством (Blancou *et al.*, 1986). Современные векторы

содержат во внедряемом фрагменте наряду с целевым геном также селективный маркер, обычно *neo* или *gpt*. Селективные среды для этих маркеров блокируют репликацию вирусной ДНК, поэтому только рекомбинантные вирусы образуют негативные колонии.

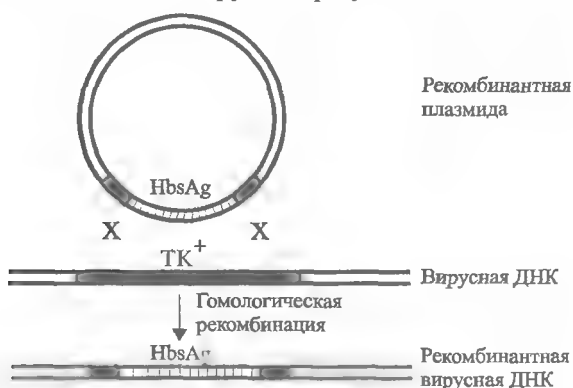


Рис. 13.3. Схема конструирования рекомбинантного вируса осповакцины.

X — места гомологической рекомбинации

Напомним, что вирус осповакцины развивается в цитоплазме. Поэтому в рекомбинантных вирусах важно использовать для экспрессии чужеродных генов вирусные промоторы. С помощью вирусных РНК-полимераз они позволяют избегать различных процессов, которые происходят в ядре и которые затрудняют экспрессию — сплайсинг, полиаденилирование, транспорт через ядерную мембрану. На порядок эффективнее промоторы фага Т7, но в этом случае в клетке должна присутствовать система, экспрессирующая РНК-полимеразу этого фага.

Вспомогательные плазмиды, используемые для конструирования рекомбинантных вирусов, полезны сами по себе в опытах, в которых достаточно наблюдать временную экспрессию клонированных генов.

Ретровирусы. Как уже отмечалось в гл. 2, ретровирусы обладают однонитевой РНК, но их жизненный цикл обязательно проходит через стадию образования двунитевой ДНК (см. рис. 2.7),

что позволяет использовать их для генно-инженерных операций. Как векторы они обладают определенными преимуществами. Во-первых, у них исключительно широкий круг клеток-хозяев. Во-вторых, структура интегрированной ДНК ретровирусов исключает возможность перестройки клонированного в ней гена (это часто случается при интеграции в клеточные хромосомы ДНК других вирусов). В-третьих, при ретровирусной инфекции клетки не погибают и в течение многих генераций продуцируют вирусы, что дает возможность в случае клонирования в ретровирусах чужеродных генов создавать продуценты, постоянно синтезирующие заданный продукт. К недостаткам следует отнести низкую концентрацию получаемых вирусных суспензий (10^5 – 10^7 частиц в 1 мл культуральной среды) и свойство вирусов развиваться только в делящихся клетках, что не позволяет использовать его для большинства дифференцированных клеток.

Вмешательство в геном ретровируса приводит к его дефектности. Однако если в нем сохранить концевые повторы LTR и сайты *P*, *Pu*, *psi* и *S*, действующие *in cis* (рис. 2.7; назначение сайтов описано в гл. 2), то недостающие функции рекомбинантного вируса могут быть компенсированы продуктами, поставляемыми *in trans* вирусом-помощником или специальными линиями клеток. Конструирование рекомбинантных ретровирусных геномов ведут в клетках *E. coli* с помощью плазмидных векторов, в которых клонирован провирус (рис. 13.4). В таких челночных векторах селективный (для животных клеток) и целевой гены обычно находятся под вирусным промотором, расположенным в левом LTR, но можно клонировать их с другими промоторами. Селективный ген удобно интегрировать вместо локуса *env*. В этом случае его трансляция будет происходить с мРНК, образующейся в результате сплайсинга по *S*-сайтам геномной РНК.

Рекомбинантной плазмидой трансформируют подходящую линию животных клеток, одновременно инфицируя их вирусом-помощником. В плазмиде будет транскрибироваться только ее провирусная часть с клонированными генами, так что инфицированные клетки будут производить смесь дефектных (рекомбинантных) и недефектных вирусов. Отметим, что интроны,

содержащиеся в клонированных генах, удаляются в процессе созревания рекомбинантных вирусов, и в дальнейшем гены существуют в безынтронном виде.

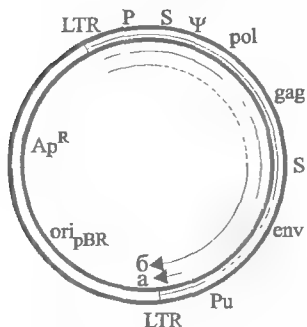


Рис. 13.4. Строение члночного ретровирусного вектора.

Тройной линией выделена провирусная ДНК. Стрелками показаны геномный (а) и субгеномный (б; сплайсинг по S-сайтам) транскрипты провируса

Функции, недостающие дефектному рекомбинантному вирусу, могут поставляться также резидентным провирусом. Удобны для этой цели провирусы, у которых нарушен процесс сборки вириона. Такой провирус вируса лейкоза мышей Молони (MuLV) содержится в мышинных клетках линии NIH 3T3 (Mann *et al.*, 1983). Трансформация этих клеток рекомбинантными плазмидами, выделенными из *E. coli*, позволяет получать чистый препарат рекомбинантных вирусов. Инфицирование ими нормальных клеток приводит к образованию рекомбинантного провируса, его интеграции в хромосому и экспрессии целевого гена.

Аденовирусы. У человека аденовирусы инфицируют предпочтительно клетки эпителия верхних дыхательных путей, приводя к образованию доброкачественных опухолей. Они инфицируют также большую гамму делящихся и неделящихся (дифференцированных) животных клеток, вызывая их гибель. Вирусы проникают в клетку путем рецептор-опосредованного эндоцитоза и, разрушив эндосому, оказываются в цитоплазме. Их двунитевая линейная ДНК длиной 36 т.п.н. транскрибируется и реплицируется в ядре.

Аденовирусы удобны в качестве векторов, так как: 1) имеют широкий круг клеток-хозяев; 2) размножаются до 10^5 вирусов на клетку, образуя приблизительно 10^{11} частиц в 1 мл культуральной среды; 3) обеспечивают высокий уровень экспрессии, поскольку клетки остаются живыми до поздних стадий инфекции; 4) их ДНК не интегрируется в клеточную хромосому, минимизируя тем самым риск активации онкогенов. У вирусов очень

сложная система транскрипции ранних и поздних генов, что снижает возможность замещения вирусных генов на клонированные. Удобен для этой цели локус *E1*, отвечающий за репликацию вирусной ДНК. В векторе он замещен на экспрессионную кассету, вмещающую до 6–8 т.п.н. чужДНК. Создана линия клеток, в которых локус *E1* конститутивно экспрессируется. В таких клетках дефектные по этому локусу аденовирусные векторы способны реплицироваться и образовывать зрелые вирионы. При инфекции ими нормальных клеток векторная нереплицирующаяся ДНК сравнительно долгое время поддерживается в ядре в плазмидном состоянии, позволяя экспериментировать с изучаемыми генами.

Бакуловирусы. Эти вирусы инфицируют насекомых. При своем развитии они образуют в клеточном ядре белковые тела включения, состоящие в основном из полиэдрина, ген которого обладает мощным промотором (p_{PH}). Именно этот промотор используют для экспрессии в клетках насекомых клонированных генов. Большой размер генома бакуловирусов (около 130 т.п.н.) вынуждает использовать такой же метод конструирования рекомбинантных вирусов, как и при работе с вирусом осповакцины (см. рис. 13.3). Для работы с вирусом ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcMNPV) фирма “Invitrogen” предлагает в качестве вспомогательного вектора плазмиду pBlueBacHis2 с вариантами А, В и С для разных рамок считывания (рис. 13.5). Экспрессионная кассета, включающая в себя информацию о полигистидиновом тракте, сайте действия энтерокиназы ЕК и эпитопе Ері (см. гл. 10), а также сайт поликлонирования MCS, подчинена промотору p_{PH} . С одной стороны кассета фланкирована вирусным геном ORF1629, а с другой — 5'-частью гена *lacZ*, управляемого вирусным промотором p_{EFL} (early-to-late, переключение с ранних функций на поздние). В вирусной ДНК рядом с геном ORF1629 внедрена 3'-часть гена *lacZ*, частично перекрывающаяся с его 5'-частью, находящейся в плазмиде. Экспрессионная кассета, содержащая клонируемый ген, оказывается в составе вирусной ДНК после ее гомологической рекомбинации с плазмидой *in vivo*. Рекомбинантный вирус отыскивается по голубой окраске негативных колоний,

являющейся следствием активности восстановленного гена *lacZ*. Система обеспечивает эффективную очистку синтезированных белков и получение их в индивидуальной форме (см. гл. 10).

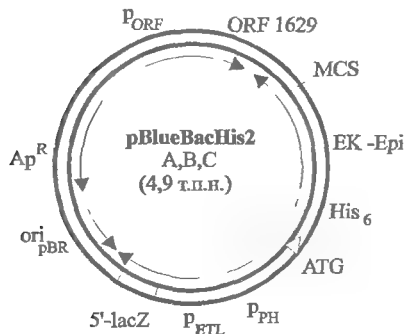


Рис. 13.5. Строение вспомогательной плазмиды BlueBacHis2, используемой для конструирования рекомбинантных бациллоуирусов.

Знак $\triangleright$ в дуплексе — иницирующий кодон для синтеза гибридного белка; MCS — полилинкер для встраивания целевого гена

Плазмидные векторы

В целях обеспечения возможности конструирования рекДНК в клетках *E. coli* плазмидные векторы для работы с животными клетками делают челночными. Отметим, что в области 2067–2533 п.н. плазмиды pBR322 есть “ядовитая” последовательность, препятствующая репликации челночных векторов в животных клетках. Она отсутствует в ряде ее производных, в частности, в плазмиде pAT153 (см. рис. 7.3), которые и следует применять для соответствующих конструкций.

Репликатор вируса SV40. Первый из таких векторов, плаزمида pSV2, содержит репликатор вируса SV40 и его раннюю экспрессионную кассету, а также *EcoRI*-*PvuII*-рестрикт плазмиды pBR322, включающий *ori*-сайт и маркер Ap^R (Mulligan, Berg, 1980; 1981a,b). Вирусная часть вектора состоит из трех фрагментов. Фрагмент *PvuII*-*HindIII* (342 п.н.) содержит *ori*-сайт и промотор гена *A*, рядом с которым можно внедрять чужеродный ген. Второй фрагмент несет малый t-интрон. В третьем фрагменте (*Bam*HI-*Bcl*II, 237 п.н.) на разных нитях расположены сайты полиаденилирования для ранних и поздних РНК. В векторе pSV2 клонировали и экспрессировали бактериальные селективные гены *neo* и *gpt* и мышинный ген *dhfr* (рис. 13.6,a).

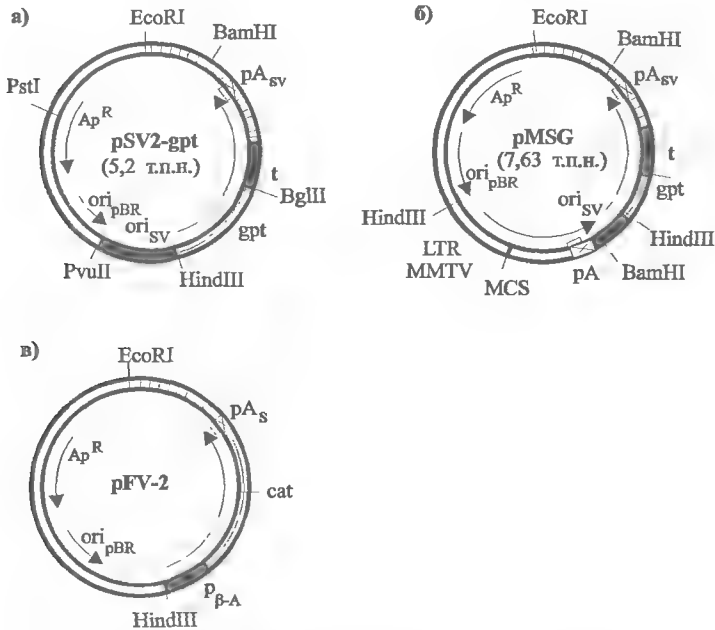


Рис. 13.6. Строение плазмидных векторов pSV2-gpt (а), pMSG (б) и pFV-2 (в).

pA_{sv} и *pA_s* — сайты полиаденилирования, (соответственно вируса SV40 и гена гормона роста лосося); *t* — малый *t*-интрон; LTR MMTV — терминальный повтор с промотором вируса опухоли молочной железы мыши; MCS — полилинкер, *pβ-A* — промотор гена β-актина карпа. Незаштрихованная часть — фрагменты плазмиды pBR322; тройная линия — селективный маркер

Кроме *E. coli* вектор pSV2 реплицируется только в COS-клетках. Модифицированный же вариант этого вектора — pSV3, полученный путем внедрения в него через *Bam*HI-сайт *Bam*HI-*Bgl*II-фрагмента SV40 ДНК, содержащего информацию о синтезе Т-антигена, реплицируется в любых клетках обезьяны. Через 70–90 ч после трансформации клетка накапливает более 10^5 копий рекомбинантной плазмиды и погибает. Поэтому эти векторы используют для наблюдения временной экспрессии. Но с частотой около 10^{-5} – 10^{-4} можно получать и стабильные трансформанты

клеток человека, обезьяны, мыши, хомяка и т.п., при этом плазмиды типа pSV интегрируются в клеточные хромосомы.

Плазмиды с клонированными в описанной экспрессионной кассете селективными генами, а также генами-репортерами *cat* и *lux*, широко используются в молекулярной биологии животных для решения различных проблем. Однако для обеспечения экспрессии целевого гена нужна дополнительная кассета. В векторе pMSG такую кассету составляют промотор из терминального повтора LTR вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), полилинкер, малый t-интрон и сайт полиаденилирования вируса SV40 (рис. 13.6,б).

Плазмиды без эукариотического репликатора. Замена в плаزمиде типа pSV промотора SV40 на промотор вируса саркомы Рауса, расположенного в его LTR-повторе, делает экспрессию селективируемых генов в образовавшихся векторах pRSV-*gpt* и pRSV-*neo* еще более эффективной. Конечно, эти векторы используют для наблюдения временной экспрессии. Этой же цели служат и аналогичные векторы серии pFV, предназначенные для экспрессии чужеродных генов в клетках рыб (Liu *et al.*, 1990). Их экспрессионная кассета состоит из промотора, энхансера и интрона гена β -актина карпа и сайта полиаденилирования гена гормона роста лосося (рис. 13.6,в). Примечательно, что эта кассета работает и в клетках животных.

Репликация вируса папилломы быка (BPV). Папилломавирусы инфицируют высших позвоночных, включая человека, и вызывают у них появление доброкачественных опухолей эпителия (в том числе бородавок). Вирус папилломы быка, как и все папилломавирусы, не развивается в клеточных культурах, но вызывает онкотрансформацию культивируемых клеток грызунов, в которых вирусная кольцевая ДНК (7954 п.н.) реплицируется и поддерживается в виде мультикопийной плазмиды. Это свойство позволило создать челночные плазмидные векторы, в которых поздние гены вируса заменены чужеродными. Рекомбинантные векторы могут длительное время поддерживаться в плазмидном состоянии (100–200 копий на клетку) или интегрироваться в большом числе копий в клеточную

хромосому. А это означает, что BPV позволяет создать клеточные линии, постоянно экспрессирующие чужеродные гены любых размеров. Стандартные селективные маркеры (*tk*, *gpt*, *neo*), включенные в векторы, позволяют проводить отбор нужных трансформантов. Столь же стандартны используемые экспрессионные кассеты.

Репликатор вируса Эпштейна–Барр (EBV). Этот герпесвирус инфицирует только В-лимфоциты приматов, не вызывая их лизиса. Некоторые из этих клеток приобретают способность к неограниченному делению, превращаясь в лимфобласты, в ядре которых вирусная кольцевая ДНК (172 т.п.н.) реплицируется и поддерживается в виде мультикопийной плазмиды. На основе репликатора EBV создан ряд челночных плазмидных векторов.

Современные векторы. Примером могут служить векторы серии pcDNA3.1 (фирма “Invitrogen”), которые содержат весь необходимый арсенал для поиска необходимых клонов и очистки продукта (рис. 13.7). Эти челночные векторы поставляются в наборе из трех плазмид для выбора правильной рамки считывания. Они имеют по две экспрессионные кассеты, одну для выражения селективного маркера (промотор и сайт полиаденилирования вируса SV40) и вторую для получения целевого белка (промотор цитомегаловируса, CMV, и сайт полиаденилирования гена гормона роста быка, BGH). Во второй кассете находится локус, кодирующий вспомогательную часть гибридного белка (см. гл. 10), которая обеспечивает возможность его очистки (His_6), маркирования целевого белка (эпитопа Epi) и отщепления целевого белка от гибридного (ЕК-сайт). Вслед за локусом (в других вариантах — перед ним) расположен полилинкер MCS, который после внедрения в него целевого гена обуславливает N- или C-концевое расположение вспомогательной части гибридного белка. Полученный гибридный белок затем афинно очищают и обрабатывают энтерокиназой для получения целевого продукта. При необходимости внедренный ген может быть транскрибирован *in vitro* РНК-полимеразой фага T7, для чего имеется соответствующий промотор.

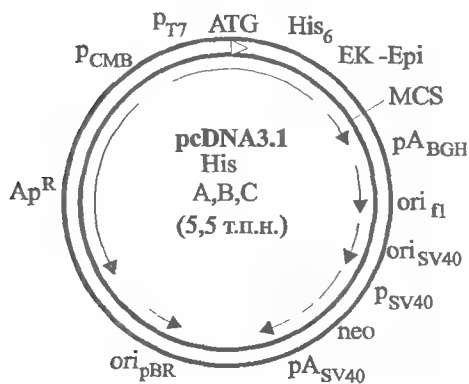


Рис. 13.7. Строение плазмидных векторов серии pcDNA3.1.

Знак Δ в дуплексе — иницирующий кодон для синтеза гибридного белка

ВВЕДЕНИЕ ГЕНОВ В ЗАРОДЫШЕВЫЕ КЛЕТКИ И ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Разработка методов введения генов в зародышевые клетки млекопитающих является крупнейшим достижением современной биологии. Получаемые при этом трансгенные животные дают возможность изучать регуляцию генов в процессе эмбриогенеза и дифференцировки, исследовать действие онкогенов, наблюдать взаимодействие клеток при формировании иммунной системы и т.д. Само животное представляет собой одновременно экспериментальную систему для выявления эффекта клонированных генов, модель для исследования генетических болезней человека и источник полезных (но чуждых для него) белков.

Основой успехов стала возможность кратковременного манипулирования *in vitro* с зародышевыми клетками животных. Это позволяет инъектировать в них ДНК, инфицировать их ретровирусами, замещать ядра, а для получения химер смешивать с клетками других эмбрионов или с плюрипотентными стволовыми клетками (рис. 13.8). Затем их имплантируют в яйцеводы или матки псевдобеременных “приемных” матерей, которые и производят потомство.



Рис. 13.8. Методы получения трансгенных и химерных животных.
По Old, Primrose (1994)

Микроинъекция ДНК. Впервые этот метод был апробирован путем инъекции SV40 ДНК в бластоцисты мыши (Jaenisch, Mintz, 1974). Рожденное потомство было, конечно, химерным, т.е. клетки не всех тканей содержали вирусную ДНК, поскольку не все клетки бластоцисты были трансфицированы. Трансгенные мыши были получены, когда ДНК (клонированный провирус Молони) была инъецирована в цитоплазму зиготы (Harbers *et al.*, 1981). Уже в то время было обнаружено, что характер экспрессии введенных вирусных геномов зависит от места их интеграции в клеточные хромосомы. В одних линиях

трансгенных мышей продукция вируса начиналась в клетках печени еще на стадии плода, в других — в селезенке, вскоре после рождения. Имелись также линии, в которых вирусы не продуцировались совсем, несмотря на присутствие provirusa.

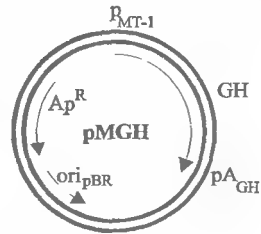
Подобная временная и тканевая специфичность экспрессии была выявлена и у трансгенных мышей, несущих индивидуальные чужеродные гены (Gordon, Ruddle, 1981). Эти авторы инъецировали клонированные гены TK^+ вируса простого герпеса и β -глобина человека ДНК в мужской пронуклеус (он больше по размеру) только что оплодотворенных *in vitro* яйцеклеток, что оказалось более эффективным способом, чем инъекция в цитоплазму. Обработанные клетки сначала культивируют *in vitro* до стадии морулы или бластоцисты, а затем имплантируют “присмным” матерям. До 40 % родившегося потомства является трансгенным. Как показали результаты опытов, интеграция чужДНК происходит в различные сайты разных хромосом, и поэтому нельзя предсказать характер экспрессии чужеродных генов. Однако во многих случаях экспрессией можно управлять, если гены присоединять к индуцибельным промоторам. Так, ген TK^+ был поставлен под контроль промотора гена металлотионина-I (MT) мыши. Этот белок участвует в регуляции обмена цинка и связывает ионы тяжелых металлов. Поэтому с помощью цинка и кадмия удалось индуцировать экспрессию гена TK^+ в разных тканях полученных трансгенных мышей, причем тканеспецифичность экспрессии соответствовала той, которую проявляет сам ген MT (Brinster *et al.*, 1981). Число копий гена в клетке у разных особей варьировало от 1 до 150. Трансгенные мыши передавали ген TK^+ своему потомству, но количественно характер экспрессии у разных потомков был различным. Предполагается, что это вызвано вариациями метилирования или структуры хроматина в сайтах интеграции генов.

Аналогичным образом была осуществлена регуляция экспрессии геномного гена гормона роста крысы (GH), помещенного в плазмиде рМGH под промотор гена MT и сохранившего свой сайт полиаденилирования (рис. 13.9). Фрагмент рекомбинантной плазмиды с экспрессионной кассетой был инъецирован в мужской пронуклеус 170 оплодотворенных яйцеклеток мыши. 21 мышь дала потомство. Треть потомства содержала гены GH , число

которых в клетках разных линий мышей изменялось от 1 до 35. Пропорционально менялась и концентрация самого гормона, причем в данном случае его синтез слабо зависел от добавляемого в пищу цинка. Избыточное количество гормона способствовало развитию гигантизма: наиболее крупные особи были тяжелее нормальных животных почти в два раза (Palmiter *et al.*, 1982).

Рис. 13.9. Рекombинантная плазмида pMGH, несущая ген гормона роста *GH* крысы под контролем промотора гена металлотионина-I.

P_{MT} — промотор гена металлотионина-I;
 pA_{GH} — сайт полиаденилирования гена гормона роста



Данный гормон секретируется. Его концентрация в плазме крови превышала в 100–1000 раз его нормальное содержание в плазме крови трансгенных животных и была много выше, чем в клеточных культурах, сконструированных для производства того же гормона. Поэтому был поднят вопрос о возможно большей экономичности технологии получения генно-инженерных продуктов от животных-доноров, чем от клеточных (бактериальных или животных) технологий. Описанная работа способствовала многочисленным попыткам применить этот метод для увеличения веса животных, надоев молока и т.п.

Метод микроинъекции ДНК в цитоплазму оплодотворенных яйцеклеток оказался единственным эффективным способом получения трансгенных рыб. Наибольшее число попыток связано с введением геномных генов или кДНК гормонов роста человека и форели. Во многих случаях было показано, что гетерологичные гены интегрируются в клеточную ДНК, передаются потомству и экспрессируются, приводя к ускоренному развитию рыб и увеличению их веса (см. обзор Chen, Powers, 1990).

Инфицирование ретровирусами. Метод технически прост: рекомбинантный вирус добавляют к 8-клеточному эмбриону, лишенному защитной оболочки (*zona pellucida*), и затем вводят его “приемной” матери. К недостаткам следует отнести мозаичность

получаемого потомства и, конечно, потенциально возможную экспрессию клеточных генов под влиянием вирусных LTR.

Использование эмбриональных стволовых клеток. Уже подчеркивалось, что чужДНК интегрируется в клеточные хромосомы в случайных локусах при любом способе ее введения. При работе с трансгенными животными, полученными с помощью вышеописанных методов, это означает вынужденную констатацию такого факта и его последующий анализ. Действительно, в данном случае провести предварительный анализ результатов интеграции чужДНК на уровне зародышевых клеток невозможно, поскольку необходим этап культивирования. Положение спасают различные культивируемые линии эмбриональных стволовых клеток. Уже говорилось (см. гл. 5), что они являются плюрипотентными и у взрослых животных дают начало многим типам клеток, включая зародышевые. Таким образом, можно трансформировать эти клетки рекДНК или инфицировать рекомбинантным ретровирусом, отобрать желаемую линию, а потом перенести рекомбинантное ядро с помощью микропипетки в оплодотворенную яйцеклетку, из которой затем удаляют оба пронуклеуса. Полученное потомство будет трансгенным. При необходимости, переноса ядра генотипически одинаковых плюрипотентных клеток, можно создавать клоны трансгенных животных.

Перенос рекомбинантных стволовых клеток в бластоцисты и последующая имплантация последних “приемным” матерям приводят к появлению химерных потомков (рис. 13.10,а,б,в). У взрослых животных доля тканей, происходящих из внесенных стволовых клеток, варьирует в широких пределах от эксперимента к эксперименту; такой тканью может быть и зародышевая. Для выявления этого случая животных скрещивают с особью нормального генотипа и анализируют потомство на появление в нем рекомбинантных признаков (рис. 13.10,г,д). Такие особи будут трансгенными гетерозиготами.

Эмбриональные стволовые клетки используют также для получения трансгенных животных, у которых произведено замещение какого-либо гена на его аллель. Для исследования свойств мутантных аллелей, в том числе нуль-аллелей, крайне важно, чтобы

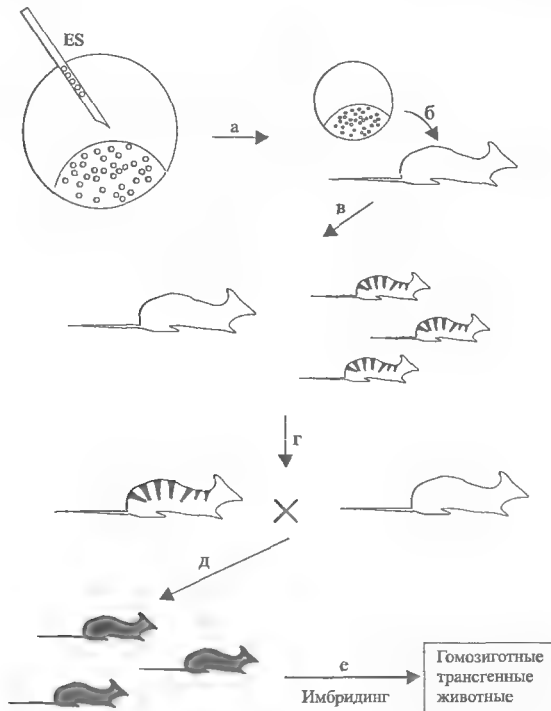


Рис. 13.10. Метод получения линии трансгенных мышей с использованием эмбриональных стволовых клеток.

Эмбриональные стволовые клетки (ES) взяты у мышей, гомозиготных по гену, определяющему черный цвет шерсти, и введены в бластоцисту мыши-альбиноса (а), которая затем имплантируется “приемной” матери (б). Это приводит к появлению химерных потомков (в). Их скрещивание с альбиносами (г) помогает выявить по цвету гетерозиготные особи (д), у которых зародышевая ткань произошла от стволовых клеток. Инбридинг среди этих особей позволяет получить гомозиготных потомков (е). Если в геном стволовых клеток был введен какой-либо ген, то полученные особи будут трансгенными

они находились в обычных для них локусах. Естественным методом замещения является гомологическая рекомбинация, но у животных этот процесс происходит крайне редко. При трансформации клеток гомологичной ДНК она преимущественно интегрируется в случайных локусах, и только небольшая часть внедрений (10^{-3} – 10^{-2}) происходит благодаря рекомбинации через гомологичный сайт. Частота гомологической рекомбинации пропорциональна размеру взаимодействующих участков и достигает насыщения (100-кратного увеличения частоты) при длине около 14 т.п.н., причем рекомбинация происходит главным образом в ранней S-фазе.

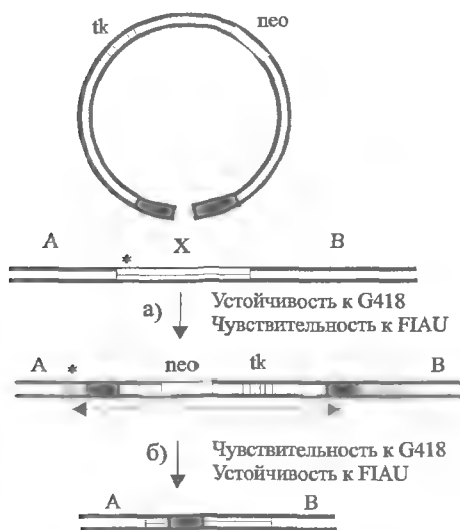


Рис. 13.11. Двухэтапный метод замещения аллелей в эмбриональных стволовых клетках с помощью гомологической рекомбинации: *a* — рекомбинация между плазмидой и хромосомой, приводящая к дупликации искомого гена; *б* — внутрихромосомная рекомбинация, приводящая к удалению мутантного аллеля гена. Замещающий аллель зачернен, замещаемый аллель выделен тройной линией; * — замещаемая мутация. Горизонтальной двунаправленной стрелкой обозначен удаляемый сегмент дупликации. Вектор, несущий селективные гены *tk* и *neo*, линейризован

Для выявления этих редких событий предложено использовать специальный вектор, содержащий в качестве селективных маркеров ген *neo* и ген *tk* вируса простого герпеса (рис. 13.11). Присутствие последнего в клетках делает их чувствительными к аналогам нуклеозидов ганцикловиру и 1-(2-дезоксидеокси-2-флюоро-β-D-арабинофуранозил)-5-йодоуридину (FIAU). В вектор встраивают

желаемый аллель, причем из-за того, что частота гомологической рекомбинации несколько выше для линейной ДНК по сравнению с кольцевой, предусмотрена линеаризация вектора в области внедряемого гена (Hasty *et al.*, 1991). Клетки трансформируют рекомбинантным вектором, а трансформанты отбирают по устойчивости к G418 и проверяют на чувствительность к FIAU. В трансформантах, в которых интеграция рекомбинантного вектора в хромосому произошла за счет гомологической рекомбинации, целевой ген тандемно дуплицирован. Поэтому в них с определенной частотой происходит внутримолекулярная рекомбинация, сопровождающаяся выщеплением векторной вставки вместе с селективными генами. Такие клетки отбирают по устойчивости к FIAU и проверяют на чувствительность к G418. Появление в клетке другого аллеля определяют методом ПЦР (см. приложение).

Далее отобранные стволовые клетки переносят в бластоцисты и с помощью “приемных” матерей получают химерных потомков, гетерозиготных в некоторых тканях по исследуемому гену. Среди них отыскивают, как описано выше, особи, у которых химерной является зародышевая ткань. Последующее скрещивание гетерозиготных животных позволяет выявить гомозиготные особи по исследуемому гену.

Использование транспозонов. Перенос генов с помощью транспозонных векторов, как и в случае использования ретровирусов, имеет определенные преимущества. Здесь интеграция генов происходит с использованием сайт-специфических транспозаз, что предохраняет чужеродные гены от перестроек и делает экспрессию и регуляцию внесенных генов более контролируемой.

Впервые такой способ переноса чужеродных генов в зародышевые клетки был предложен для дрозофил (Spradling, Rubin, 1982). Авторы использовали для этой цели Р-элемент (см. рис. 2.6), делетирование центральной части которого не блокирует его способности к транспозиции в присутствии Р-элемента-помощника. Это позволяет внедрять в него фрагменты ДНК размером в несколько десятков тысяч пар нуклеотидов. Транспозазная активность Р-элемента проявляется только в зародышевой ткани и только, если в ее клетках нет резидентного транспозона (см. гл. 2). Поэтому местом для введения генов был выбран постериорный

конец оплодотворенной яйцеклетки на стадии после нескольких делений ядра, поскольку именно там формируется зародышевая ткань.

Апробирование метода было проведено на мушках М-типа (в них Р-элемент отсутствует), гомозиготных по мутантному гену *rosy*. Особи с такой мутацией имеют коричневый цвет глаз вместо красного, так как ген *rosy*⁺ кодирует ксантиндегидрогеназу, участвующую в синтезе предшественника пигмента. Р-элемент был клонирован в плазмиде pBR322 (образовалась плазида рп25.1), и в него был вставлен ген *rosy*⁺ (плазида ргу-1). Обе плазмиды ввели в оплодотворенную яйцеклетку, где Р-элемент мигрировал из плазмиды в хромосомные сайты. До половины мух, развившихся из обработанных эмбрионов, дали потомство с измененным цветом глаз. Молекулярный анализ показал, что перенесенные сегменты ДНК с геном *rosy*⁺ (около 10 т.п.н.) находятся в Р-элементах без каких-либо перестроек.

ВВЕДЕНИЕ ГЕНОВ В ТКАНИ И ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ

Проблема введения генов в ткани была поднята в связи с поиском подходов к генной терапии человека. Генную терапию определяют как перенос нового генетического материала в клетки индивидуума для достижения терапевтического эффекта. Таким образом, речь идет о лечении не только генетических, но и других заболеваний (рак, СПИД и т.п.), поэтому методы генной терапии различны. В случае генетических болезней генная терапия осуществляется путем введения нормального гена в ту ткань, где этот ген должен функционировать. Крайне желательно, чтобы введение сопровождалось замещением мутантного аллеля. Однако технически это пока не удастся, и обычно добавленные в клетки гены функционируют на фоне мутантных в силу своей доминантности.

Первый успешный опыт по переносу генов в клетки определенной ткани был проведен с мышами (Cline *et al.*, 1980). Авторы выделили из устойчивых к метотрексату мышинных клеток мультиплицированные гены *dhfr*, ввели их в культивируемые эритроидные клетки мыши и последние трансплантировали в ткань костного мозга этой же мыши. Гены *dhfr* экспрессировались в ней; уровень дигидрофолатредуктазы в крови экспериментальных животных оказался в два-три раза выше, чем в крови контрольных мышей.

Генетические болезни человека и генная терапия

Описано уже около 5000 наследственных заболеваний человека, но только приблизительно для тысячи из них найдены и картированы повреждаемые гены. Сведения о строении генома человека накапливаются в периодически обновляющейся энциклопедии Мак-Кьюсика. В 11-м издании приведены данные о 6678 картированных генах, из которых для более чем 2800 определена их функция (McKusick, 1994). Дефекты в 770 генах вызывают моногенные заболевания (муковисцидоз, мышечная дистрофия Дюшенна, фенилкетонурия, хорea Гентингтона, болезнь Гоше, гемофилии А и В и др.). Большая часть этих генов клонирована и ведется поиск методов их использования для генной терапии.

Большинство генетических болезней являются полигенными (атеросклероз, рак, артрит и др.). В этом случае предлагается не исправлять генетические дефекты, а вводить такие гены, которые ослабляют последствия этих дефектов. Например, генная терапия некоторых видов рака развивается по линии повышения иммунного ответа по отношению к раковым клеткам и по линии индуцирования гибели раковых клеток путем доставки к ним таких веществ, которые в процессе метаболизма образуют токсические для них молекулы (см. с. 427).

Вирусные инфекции могут рассматриваться как приобретенные генетические заболевания, поскольку некоторые из них (вирус Эпштейна–Барр, вирус гепатита В) могут вызвать развитие рака у инфицированных индивидуумов. Генная терапия таких людей может заключаться во введении в определенные их ткани генов с антивирусным эффектом, чтобы предотвратить их онкотрансформацию. Выявление таких тканей (клеток) определяет успех генной терапии. К примеру, известно, что основной мишенью для вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) являются CD4 лимфоциты, которые можно легко выделять из организма, вводить в них нужный ген (например, антисмысловой РНК для вирусной мРНК) и возвращать обратно. Цель манипуляций — предотвратить в клетках развитие вируса (явление предложено назвать внутриклеточным иммунитетом).

Проблемы генной терапии человека

На сегодняшний день трудности в использовании методов генной терапии связаны скорее с клеточной биологией, чем с генной инженерией (рис. 13.12). Для получения терапевтического эффекта необходимо ввести гены в большое число клеток ткани-мишени, для чего более подходят методы *ex vivo* (вне ткани). Однако типы клеток, которые можно извлекать, модифицировать *in vitro*, культивировать и реимплантировать в организм, пока немногочисленны — фибробласты, лимфоциты, гепатоциты, кератиноциты, эндотелиальные и мышечные клетки, стволовые клетки костного мозга. В реальности в клиниках пока экспериментируют с Т-лимфоцитами (острый комбинированный иммунодефицит, вызванный дефектом в гене *ADA*), гепатоцитами (семейная гиперхолестеринемия: дефект в гене рецептора липопротеинов низкой плотности), миоцитами (мышечная дистрофия Дюшенна: дефект в гене дистрофина), фибробластами (гемофилия: дефекты в генах факторов IX или VIII) и клетками эпителия бронхов (муковисцидоз: дефект в гене CF-трансмембранного фактора).

Обратим внимание, что “здоровые” гены необязательно вводят в те клетки, где они в норме экспрессируются. Например, факторы IX и VIII синтезируются в гепатоцитах, но в лечебных целях их гены вводят в фибробласты. В случаях, когда клетки с дефектным геном нельзя извлекать и культивировать, экспериментируют методами *in vivo* (инъекции в ткань изолированной рекДНК, рекомбинантного вируса, липосом с ДНК). Методы *in vivo*, по-видимому, будут применяться и в экстренных случаях, когда для использования методов *ex vivo* нет достаточного времени.

Дополнительные ограничения вызваны, по крайней мере, двумя обстоятельствами. Во-первых, даже моногенные заболевания проявляются в нескольких тканях, а инженерия *ex vivo* развита пока для ограниченного числа тканей. Во-вторых, далеко не всегда при введении нормального гена устанавливается нормальная координированная экспрессия генов, участвующих в общем процессе. Например, ген β -глобина успешно вводят в эритробласты

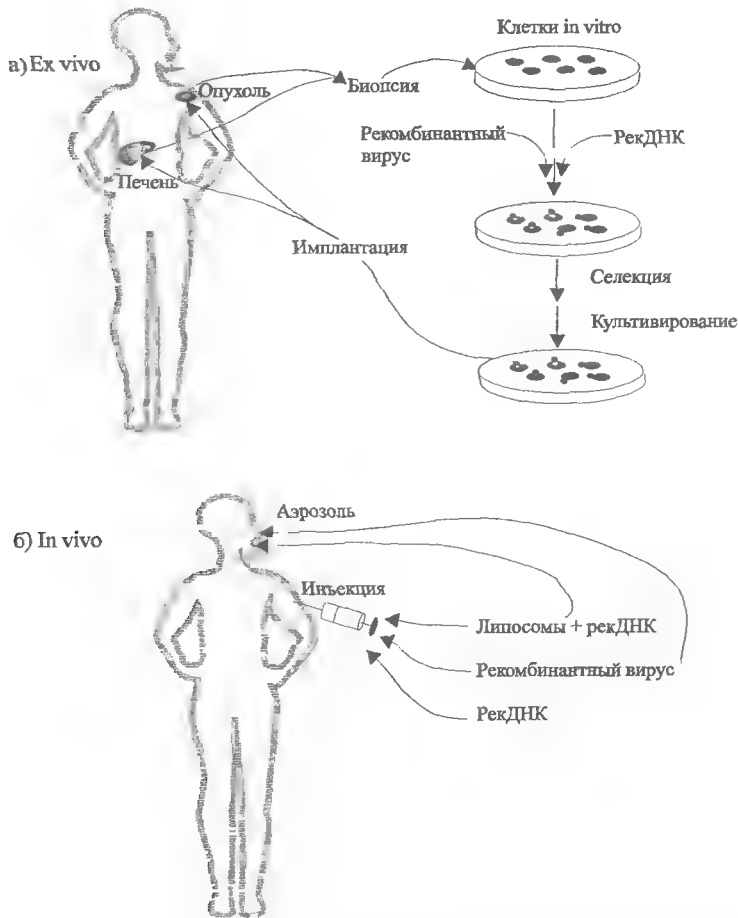


Рис. 13.12. Две стратегии генотерапии: введение терапевтических генов в клетки-мишени вне организма (а) или внутри организма (б)

обработкой *ex vivo* стволовых клеток костного мозга и последующей их реимплантацией в костный мозг, но сборка функциональных тетрамеров молекул гемоглобина происходит неэффективно из-за отсутствия координации с синтезом α -цепи глобина.

Системы переноса генов

Прежде чем приступить к генной терапии человека, каждая конкретная система (определенные ген, вектор, ткань, способ введения вектора в клетки ткани и клеток в организм) должна быть апробирована в аналогичных условиях на животных. Это необходимо для того, чтобы убедиться, что новый ген можно вводить в клетки определенных тканей и что он сохранится достаточно долго, будет экспрессироваться в клетках на необходимом уровне и не причинит вреда (клетке или всему организму).

В генной терапии главной проблемой при доставке генов является ее адресованность (перенос или экспрессия только в клетках определенных тканей), эффективность (ген доставлен в достаточное число клеток) и стабильность (гены должны функционировать у пациента достаточно долгое время). Системы, которые полностью отвечают этим требованиям, пока не созданы.

Вирусный способ. Вирусный способ доставки генов эффективен в силу своей биологичности, поэтому около 80 % испытываемых клинических протоколов основаны на использовании ретровирусных или аденовирусных векторов (см. с. 403, 404). Эти векторы сконструированы на общем подходе: вся или большая часть кодирующей последовательности в вирусном геноме заменена экспрессионной кассетой. Манипуляции же с векторами производятся с привлечением специально сконструированных клеток, в хромосомах которых содержится информация, обеспечивающая репликацию векторных геномов и сборку вирионов.

Большинство ретровирусных векторов создано на базе вируса лейкоза мышей (MLV). Векторы, в которых сохранились только концевые повторы LTR и *cis*-действующие сайты *P*, *P_u* и *psi* (см. рис. 13.4, а), позволяют клонировать до 8 т.п.н. чужДНК. Полезным свойством таких векторов является полное отсутствие вирусных белков в трансдуцированных клетках, и поэтому *in vivo* эти клетки не будут восприниматься иммунной системой организма как чужие. Это обстоятельство совместно с фактом, что терапевтический ген интегрируется в клеточную хромосому, обеспечивают стабильность терапевтического эффекта. Однако рет-

ровирусы не обладают тканеспецифичностью, и для их доставки в определенный тип клеток необходимо использовать рецептор-опосредованные способы переноса (см. с. 428) либо ограничиться методами *ex vivo*.

Как известно, эукариотические мРНК моноцистронны. Поэтому, если необходимо доставить в клетку сразу несколько терапевтических генов, то в вектор приходится встраивать дополнительные экспрессионные кассеты. Чтобы преодолеть эту техническую сложность, предложено использовать особенность пикорнавирусов, обладающих полицистронной матрицей. В их РНК есть внутренние сайты посадки рибосом IRES (Internal Ribosome Entry Sites), позволяющие им инициировать кэп-независимую трансляцию на внутренних иницилирующих кодонах. Внедрение этих локусов внутрь ретровирусной транскрипционной единицы позволяет организовать экспрессию нескольких генов с одного промотора (Adam *et al.*, 1991). Конечно, эта возможность ограничена небольшой емкостью ретровирусных векторов (8 т.п.н.).

Одна из важных проблем при использовании ретровирусных векторов для генной терапии — их потенциальная опасность. Во-первых, дефектный сам по себе вектор путем рекомбинации с дефектным провирусом-помощником может образовать инфекционный вирус. Во-вторых, не исключена возможность инактивации существенного клеточного гена в процессе интеграции векторной ДНК в хромосому. В-третьих, препарат рекомбинантного вируса может быть загрязнен сопутствующим вирусом.

Аденовирусы человека привлекательны для целей генной терапии из-за своей низкой патогенности, знания его молекулярной биологии, неинтегрируемости его ДНК в клеточную хромосому и возможности получения вируса в высоком титре. Поскольку они специфичны к клеткам дыхательных путей, то впервые аденовирусные векторы применили для генной терапии муковисцидоза. Это заболевание распространено особенно в европейской и североамериканской популяциях (3–5 случаев на 10 000 детей). Оно вызвано дефектом гена CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), белок которого регулирует водосолевой обмен в эпителиальных клетках.

Нарушение его функции ведет к повышенной вязкости секрета бронхо-легочных путей и хронической бактериальной инфекции, что в половине случаев кончается гибелью больного в возрасте до 30 лет. Дефектный ген рецессивен. Введение в клетку *in vitro* даже одной копии нормального гена приводит к исправлению дефекта. Однако клетки эпителия высокодифференцированы, крайне медленно делятся, и введенные пациенту модифицированные клетки не восстанавливают эффективно достаточную площадь в бронхо-легочных путях. Поэтому был использован аэрозольный метод доставки нормального гена непосредственно в дыхательные пути с помощью аденовирусного вектора. Первые клинические испытания (Crystal *et al.*, 1994) показали, что введенные гены действительно работают в дыхательном эпителии. Однако, находясь в ядре и не будучи интегрированными, они постепенно терялись при клеточных делениях.

Аденовирусные векторы первого поколения (с делецией локуса *E1*, см. с. 404) сохранили поздние гены, кодирующие структурные белки. Это является еще одной причиной их нестабильности. Введенные в организм клетки с вирусными белками воспринимаются как чужеродные и постепенно элиминируются иммунной системой. Эти факты говорят о том, что аденовирусные векторы больше подходят для терапии рака, где достаточно временной экспрессии терапевтических генов, чем для исправления наследственных дефектов.

Из других вирусов упомянем вирус простого герпеса, который потенциально полезен для генной терапии болезней Паркинсона и Альцгеймера, поскольку он инфицирует нервные клетки и его ДНК не интегрируется в клеточный геном. Изучаются возможности для генной терапии аденоассоциированного вируса (AAV). Этот дефектный вирус размножается только в присутствии аденовируса или вируса простого герпеса, а в отсутствие помощников его ДНК интегрируется в определенный сайт хромосомы 19 человека, позволяя одновременно достигать стабильности введенного гена и избегать нежелательных последствий из-за непредсказуемости интеграции генов.

Миобласты как клеточные векторы. Миобласты являются предшественниками клеток скелетных мышц: сливаясь друг с дру-

гом, они образуют мышечные волокна, т. е. многоядерные клетки, содержащие несколько тысяч ядер и длина которых достигает у человека полуметра. Миобласты легко выделяются из мышечной ткани, хорошо выращиваются в культуре, сохраняя при этом способность к дифференцировке. При инъекции в мышечную ткань они становятся ее интегральной частью, сливаясь с имеющимися волокнами или образуя новые. Стабильная экспрессия введенных (нормальных) генов в ядрах трансплантированных миобластов наблюдается до 6 мес. Таким образом, генная терапия с помощью миобластов пригодна для лечения любых форм мышечных заболеваний и не требует идентификации дефектного гена. Впервые она была применена для лечения мышечной дистрофии Дюшенна.

Мышечная дистрофия Дюшенна характеризуется отсутствием дистрофина, что приводит к прогрессирующей дегенерации скелетных и сердечных мышц и гибели на втором десятке жизни. Болезнь затрагивает в среднем одного из 3500 мальчиков. Один из возможных подходов к терапии этой болезни — восстановление экспрессии дистрофина путем трансплантации миобластов в мышцы. Излечение может и не наступить, поскольку болезнь затрагивает различные типы мышц, но возможно существенное облегчение. Описан положительный клинический эффект, когда 21 мальчику в возрасте 6—14 лет, имеющим это заболевание, трансплантировали в мышцы нормальные миобласты, взятые от братьев или отца и выращенные в культуре до нужного количества (Law *et al.*, 1992). В сумме за 48 инъекций было введено $5 \cdot 10^9$ клеток в разные мышцы обеих нижних конечностей с отчетливым терапевтическим эффектом. В качестве иммунодепрессанта использовался циклоспорин.

Заманчивой идеей является генная терапия различных заболеваний путем введения в кровотоки клеток, содержащих нужный ген. В экспериментах с мышами были опробованы различные типы культивируемых клеток, но в большинстве случаев клетки или подвергались онкотрансформации, или синтез продукта быстро прекращался. Только миобласты рассматриваются как потенциальный вектор благодаря их уникальной способности сливаться с мышечными волокнами. В опытах с мышами введенные в

кровеноток миобласты, содержащие ген гормона роста человека, вошли в состав мышечных тканей и экспрессировали этот ген: гормон определялся в плазме крови около трех месяцев. Подобные результаты позволяют рассматривать возможности использования миобластов для доставки генов, кодирующих другие гормоны, факторы коагуляции, ростовые факторы и разные противоопухолевые агенты.

Клетки костного мозга. Эти клетки можно легко выделить, провести с ними манипуляции *in vitro* и реимплантировать тому же пациенту. Костный мозг представляет собой гетерогенную популяцию дифференцированных (эритроциты, лимфоциты и т.д.) и стволовых клеток. Последние обеспечивают воспроизведение клеточной популяции костного мозга и поэтому являются главной мишенью операций по генной терапии. Их доля в ткани невелика — не более 0,5%.

Казалось бы, что генную терапию можно применять, прежде всего, для лечения генетических заболеваний крови, вызывающих появление аномальных гемоглобинов. Однако такая терапия пока недоступна, поскольку еще не изучен механизм регуляции синтеза глобинов, т. е. пока нельзя осуществить регулируемую экспрессию генов глобина, введенных в клетки костного мозга. Для генной терапии более подходят нерегулируемые, но экспрессирующиеся в клетках костного мозга гены гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (*HGPRT*), пуриннуклеозидтрансферазы (*PNP*) и аденозиндеаминазы (*ADA*), дефектность которых вызывает тяжелые заболевания. Например, аденозиндеаминаза катализирует дезаминирование аденозина и дезоксиаденозина в инозин и дезоксиинозин, соответственно. При ее отсутствии дезоксиаденозин накапливается в организме до уровня, который токсичен для некоторых типов клеток, в том числе Т-лимфоцитов (инозин нетоксичен). Генетический дефект обычно приводит детей к гибели от инфекционных заболеваний.

Первая процедура по генной терапии человека была осуществлена именно с геном *ADA* (Blaese, Anderson, 1990). Пациентом была четырехлетняя девочка с дефектом по этому гену. Из ее крови были выделены лимфоциты, которые затем выращивали в лаборатории в условиях, способствующих предпочтительному де-

лению Т-лимфоцитов. Далее Т-лимфоциты были инфицированы ретровирусным вектором, несущим гены *ADA* с промотором LTR и *neo* с промотором SV40. Рекомбинантные клетки выращивали до общего количества в несколько миллиардов и ввели в кровь пациентке. Эффект был положительным. Общее число лимфоцитов поднялось до нормального уровня, а количество аденозиндеаминазы в Т-клетках составило 25 % от нормального содержания. Эти цифры были почти неизменными в течение полугода наблюдения.

Генная терапия рака. Число больных с дефектом *ADA* невелико, во всем мире их насчитывается несколько сотен. Эксперименты по генной терапии рака более многочисленны, что вызвано распространенностью этого заболевания, возможностью манипулирования клетками пациента *ex vivo* и этическими причинами, принимающими во внимание неизлечимость ряда случаев. Стратегия генной терапии рака зависит от молекулярной диагностики заболевания. Напомним, что известно два класса генов, мутации в которых приводят к развитию злокачественных опухолей. Это протоонкогены (их известно около сотни) и супрессоры опухолей (известны десятки). В случае, когда опухоль была вызвана суперэкспрессией онкогена *K-RAS*, ее дальнейшее развитие удалось предотвратить введением в клетки ретровирусного вектора, обеспечившего синтез антисмысловой (комплементарной) РНК к мРНК онкогена. Белок p53 подавляет развитие опухолей, а его дефектность вызывает рак. Введение неповрежденного гена p53 в опухолевые клетки, дефектные по гену p53, приводит к гибели этих клеток.

Если причина заболевания неизвестна, то прибегают к генной терапии общего действия, положительный эффект которой хотя и замечен, но относителен. С этой целью используют интерлейкин-2 для повышения иммунного ответа или индуцируют гибель раковых клеток путем доставки к ним (в них) фактора некроза опухолей TNF. Из солидной опухоли пациента выделяют лимфоидные клетки TIL (tumor infiltrating lymphocytes) и с помощью ретровирусного вектора вводят в них ген фактора некроза опухолей *TNF* (Hwu *et al.*, 1993) или интерлейкина-2, а затем после наращивания массы реимплантируют их пациенту. Такой

же эффект достигается введением этих генов *ex vivo* непосредственно в опухолевые клетки.

Рецептор-опосредованный перенос. Идея этого метода заключается в использовании специфики взаимодействия рецептор-лиганд, присущей многим клеткам, для доставки в них терапевтических генов. Эти гены могут находиться в виде препаратов изолированной ДНК или быть в составе рекомбинантных вирусов или липосом. Например, лигандом для рецепторов гепатоцитов является белок трансферрин. Изолированную ДНК в виде суперскрученной плазмиды “пришивают” с помощью полилизина к лиганду и образовавшийся конъюгат инъецируют прямо в кровь, которая и доставляет его в печень. Рецептор “улавливает” лиганд, и ДНК-белковые комплексы поглощаются эндоцитозом (Curiel *et al.*, 1991; рис. 13.13,а). Однако при этом большая часть вошедшей ДНК деградирует в эндосоме. Для предотвращения этого процесса предложено использовать аденовирус, чьи белки способны разрушать эндосомы (рис. 13.13,б). С помощью специфических антител конъюгат можно присоединить к одному из поверхностных белков мутантного вируса, который не способен узнавать свой рецептор и размножаться, но защищает ДНК от деградации (рис. 13.13,в). Такой тройной комплекс будет специфически и эффективно доставлять гены в нужные клетки (Miller, Vile, 1995).

Приведенный выше пример демонстрирует одну из возможностей изменять специфичность вирусного вектора путем присоединения к вириону дополнительного белка, узнающего клеточный рецептор. Другая возможность, реализуемая при работе с ретровирусными векторами, заключается в замене гена *env* на одноименный ген родственного вируса или в направленной модификации этого гена с целью изменить его специфичность. Например, когда у вируса саркомы Рауса заменили 3'-концевую часть гена *env* на ген гемагглютинина вируса гриппа, то он стал инфицировать человеческие клетки (Dong *et al.*, 1992). Рекомбинантный белок Env эффективно встраивается в вирион, обеспечивая поддержание новой специфичности. Такой вектор потенциально полезен для генной терапии рака, поскольку способен осуществить инфицирование всех клеток ткани. Следует, конеч-

но, добиваться, чтобы домены белка E_{nv}, отвечающие за установление контакта вирус–клетка и поглощение вируса, не мешали функционированию друг друга.

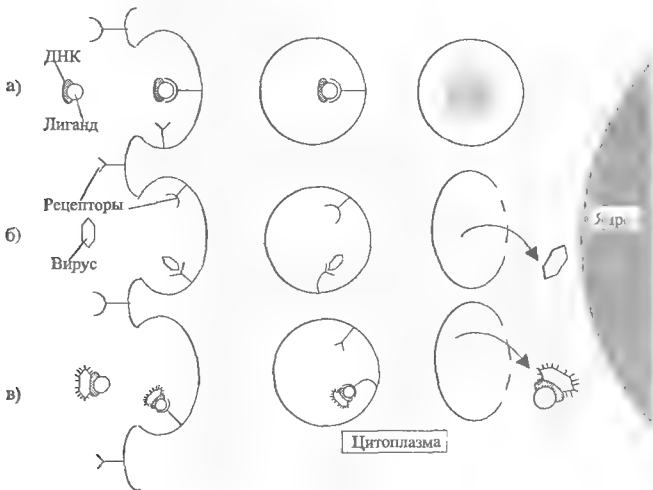


Рис. 13.13. Метод рецептор-опосредованного переноса терапевтических генов в клетки-мишени с использованием изолированной ДНК и аденовируса: *а* — рецептор “улавливает” лиганд и весь ДНК-белковый комплекс поглощается эндоцитозом; *б* — эндоцитоз аденовируса и разрушение им эндосомы; *в* — эндоцитоз конъюгата ДНК-лиганд-мутантный аденовирус и его освобождение внутри клетки

Возможность адресной доставки терапевтических генов с помощью липосом зависит от многих факторов. При введении в организм липосомам необходимо преодолеть его защитную систему, в частности, избежать поглощения макрофагами. Это в какой-то мере достигается добавлением в липидный слой отрицательно заряженных молекул, например полиэтиленгликоля. В липидном слое должны также присутствовать вещества, способствующие их слиянию с клеточными мембранами, а также молекулы (моноклональные антитела, гормоны, ростовые факторы, вирусные белки), распознающие клетки-мишени.

Недостатком рецептор-опосредованного переноса генов (как и всех методов трансформации) является временность экспрессии перенесенных генов, что заставляет прибегать к повторным процедурам генной терапии.

Тканеспецифическая экспрессия терапевтических генов. Адресованности действия терапевтических генов можно также добиться, поставив их под контроль тканеспецифических регуляторных элементов. Число выявляемых и используемых элементов увеличивается с каждым годом. К примеру, промотор гена креатинкиназы был успешно апробирован на мышах для ограничения экспрессии кДНК дистрофина скелетными и сердечными мышцами (Cox *et al.*, 1993). Потенциально полезны промотор-энхансерные элементы генов иммуноглобулинов, специфичные для В-лимфоцитов. Ведутся эксперименты по использованию способности ретровирусов развиваться только в делящихся клетках, что может быть полезно для генной терапии рака. Например, клетки печени пролифирируют крайне медленно, и ретровирусный вектор в этом органе проявится только в опухолевых клетках.

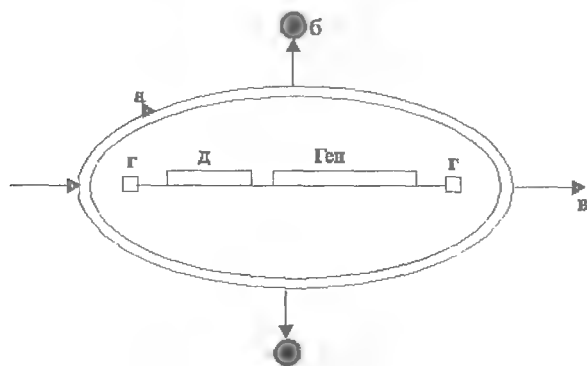


Рис. 13.14. “Идеальный” терапевтический вектор.

а — неиммуногенная оболочка; *б* — лиганды для связывания с определенным типом клеток; *в* — средство для слияния мембран вектора и клетки; *г* — локусы для направленной интеграции векторной ДНК в клеточную хромосому; *д* — промотор-энхансерный локус для тканеспецифической экспрессии

Оптимальный терапевтический вектор. Отметим еще раз, что векторы для доставки терапевтических генов, которые были бы одновременно эффективными и специфичными, пока не созданы. Теоретически такой идеальный вектор должен обладать: 1) стабильной неиммуногенной оболочкой; 2) специфическими лигандами для связывания с определенным типом клеток; 3) молекулярными средствами для слияния мембран вектора и клетки; 4) способностью внедрять векторную ДНК в клеточную хромосому путем гомологичной или сайт-специфической интеграции; 5) регуляторным локусом для тканеспецифической экспрессии (рис. 13.14).

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОВТОРЕНИЯ И ОБСУЖДЕНИЯ

13.1. В чем заключаются преимущества использования эмбриональных стволовых клеток при получении трансгенных животных?

13.2. Сравните различные методы трансформации животных клеток, принимая во внимание их области применения. Метод микроинъекции ДНК в ядра является наиболее эффективным; почему же используют и другие методы?

13.3. Охарактеризуйте преимущества и недостатки вирусных и плазмидных векторов.

13.4. Какие элементы входят в эукариотическую экспрессионную кассету?

13.5. Геномный ген встраивают в ретровирусный вектор. Какова судьба интронов, содержащихся в гене?

13.6. Размеры ДНК некоторых вирусов, используемых в качестве векторов, превышают 100 т.п.н., что затрудняет работу *in vitro*. Какой прием используют для конструирования рекомбинантного вируса?

13.7. Составьте план эксперимента по клонированию определенного животного гена с помощью вектора pсDNA3.1 (рис. 13.7), включая этапы по поиску необходимых клонов и очистки продукта.

13.8. Объясните, в чем заключается феномен временной и тканевой специфичности экспрессии у трансгенных животных, несущих индивидуальные чужеродные гены.

13.9. Составьте план эксперимента по замещению в животной клетке дефектного гена на нормальный. Как убедиться, что замена проведена успешно?

13.10. Сформулируйте проблемы, которые возникают при генной терапии человека. Какие подходы используют для их преодоления?

13.11. Почему вирусный способ доставки генов при генной терапии используют чаще других, несмотря на его потенциальную опасность?

Глава 14

ГЕНОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Согласно классификации, предложенной во введении, геномная инженерия решает проблему целенаправленной наследуемой перестройки какого-либо генома с тем, чтобы сформировавшийся организм существенно отличался по набору признаков от исходного, вплоть до отнесения его к новому виду. В применении к плазмидам и вирусам речь идет об их проявлениях в клетке. Геномную перестройку возможно осуществить следующими способами: 1) внесением в геном значительного количества дополнительной генетической информации; 2) заменой существенной части генома на функционально гомологичную часть другого генома; 3) модификацией ключевых генов с целью воспрепятствовать скрещиваемости с одновидовыми партнерами (для организмов, обладающих половым способом размножения). Поскольку имеются в виду случаи, когда внесенная информация стабильно наследуется и проявляется фенотипически на уровне организма, то работы по получению соматических гибридных клеток, созданию химерных растений и животных в аспекте геномной инженерии рассматриваются лишь как этапные или модельные эксперименты. Ряд таких экспериментов рассмотрен в гл. 5.

Целенаправленное конструирование новых геномов требует знания их структуры, понимания принципов их организации, а также учета механизмов взаимодействия генов и их продуктов. В свою очередь одним из методов исследования этих аспектов может служить геномная инженерия.

Природе также не чужда стратегия геномного конструирования. Так, результатом природной геномной инженерии вирусов, вызывающих грипп, являются его сильные эпидемии, происходящие приблизительно каждые восемь лет. Дело в том, что геном этих вирусов состоит из восьми различных фрагментов РНК, со-

державших по одному гену. При совместном внутриклеточном развитии вирусы могут обмениваться сходными фрагментами. Если этот обмен совершается между вирусами гриппа человека и животных, то возникают вирусы с новой антигенной структурой, обуславливающей распространение эпидемии.

Принципы геномного конструирования

В настоящее время геномная инженерия находится в стадии накопления экспериментального материала. Тем не менее на основе достижений молекулярной биологии и генетики можно сформулировать некоторые общие принципы геномного конструирования, которые справедливы, по крайней мере, для плазмид, вирусов и одноклеточных организмов.

Все гены организма можно разделить на облигатные и факультативные, т. е. на обязательные и необязательные для выживания организма в заданных условиях (или воспроизводства плазмид и вирусов в клетке). Чтобы продукт геномной инженерии был жизнеспособным, его геном должен содержать все облигатные гены.

Большинство генов в геноме включено в те или иные регуляторные цепи. Регуляторные механизмы обуславливают поддержание концентрации клеточных продуктов (как в количественном, так и в качественном отношении) на определенном уровне, зависящем от внешних условий (сигналов). Между частями гибридного генома, произошедшими от разных доноров, регуляторные связи в той или иной степени нарушены. Для их восстановления необходимо в определенные гены вводить мутации, создавать новые сайты рецепции регуляторных сигналов, изменять мощность или специфичность некоторых промоторов и т.п. Следовательно, регуляторные связи между совмещенными в гибридном геноме генами должны быть взаимно согласованы.

Каждый из белков в процессе выполнения своей функции взаимодействует со многими другими белками. Если он является функционально гомологичным, но чужеродным для данной клетки, то это взаимодействие может быть в различной степени специфичным. Слабую видовую специфичность проявляют, например,

рибосомные белки разных видов кишечных бактерий. Из них можно собрать функционально активные гибридные рибосомы. Высокую видовую специфичность проявляют многие гормоны животных, интерфероны и т.п. Они не функционируют в организмах “чужих” видов. Таким образом, между взаимодействующими чужеродными друг для друга белками должно быть структурное соответствие, обеспечивающее выполнение ими совместно определенной функции.

Простейшими образцами геномного конструирования являются работы по созданию векторов (см. гл. 7, 10–13). В частности, наглядным примером геномной инженерии служат фазмиды, объединяющие в себе свойства фагов и плазмид. Патент на “изобретение” фазмид принадлежит природе. К ним относятся умеренные колифаги P1 и N15, о которых говорилось в гл. 4. Их профаги находятся в плазмидном состоянии и подвергаются строгому контролю репликации. Как и другие плазмиды, они обладают свойством несовместимости (см. гл. 3). С другой стороны, будучи профагами, они имеют специфические системы иммунитета. Примерами лабораторных фазмидных конструкций являются векторы λ PMYF131 и λ ZAP (см. рис. 7.7).

К продуктам геномной инженерии можно отнести также космиды, фагмиды, дрожжевые и другие челночные векторы. Но наиболее последовательное использование принципов геномного конструирования можно проследить на бактериофагах.

Бактериофаги

Умеренным фагам свойствен ряд основных признаков — иммунность лизогенных бактерий, специфичность сайта интеграции профага в клеточную хромосому, специфичность к клетке-хозяину, антигенная структура, вирулентность. Изменение хотя бы одного из них дает начало новой разновидности фагов, что можно рассматривать как пример геномной инженерии.

Геномное конструирование можно проиллюстрировать на примере гибридов лямбдоидных фагов λ и ϕ 80 (см. гл. 4). У этих фагов генетические карты сходны (рис. 14.1), гены, занимающие одинаковые места, выполняют аналогичные функции, а геномы обладают тремя характерными особенностями.

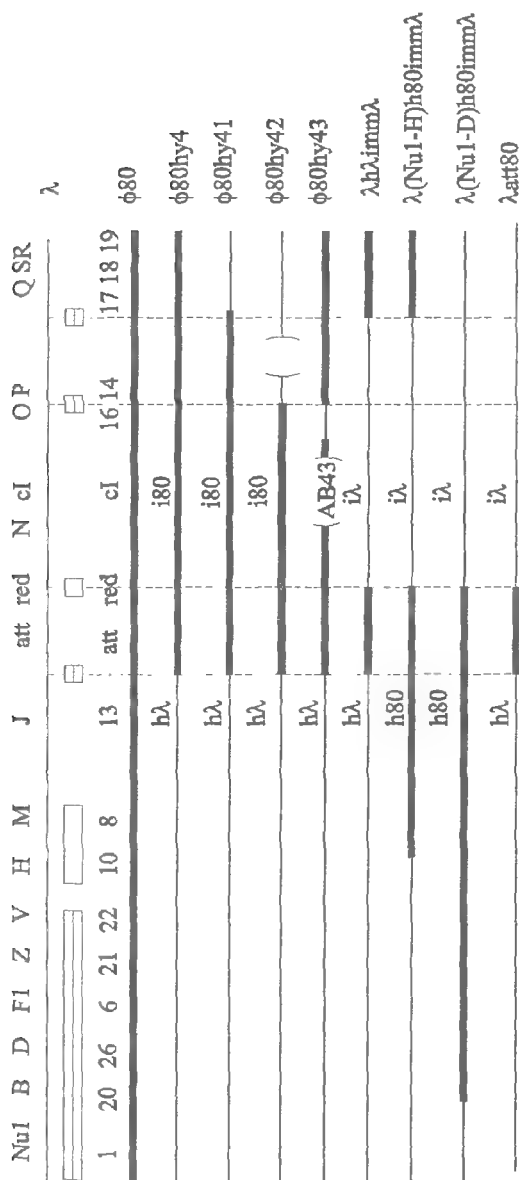


Рис. 14.1. Генетические карты фагов λ и f80 и их гибридов.

h — специфичность к клетке-хозяину; i — иммунитет; () — делеция; тонкая линия — λ ДНК; жирная линия — φ80 ДНК; области сильной (■) и слабой (□) гомологии

1. Гены, отвечающие за определенную функцию, сгруппированы вместе (к примеру, гены головки, отростка, рекомбинации, регуляции ранних функций, репликации и лизиса).

2. Почти во всех случаях гены, продукты которых взаимодействуют с фаговой ДНК в определенных сайтах, располагаются рядом с этими сайтами (гены *Nu1-A* и *cos*-сайт; *int-xis* и *att*-сайт; *N* и сайт терминации транскрипции *tL1*; *cI* и операторы *oL* и *oR* и т.д.; см. рис. 4.1).

3. В большинстве случаев функциональные блоки генов разграничиваются областями физической гомологии.

Эти особенности существенно облегчают геномное конструирование. Ведь сцепленность генов и сайтов, выполняющих определенную функцию, обеспечивает их совместную передачу в рекомбинационных процессах *in vivo* и *in vitro*, что важно для их функционирования, поскольку каждый из элементов по отдельности биологически инертен. Наличие областей гомологии между λ и $\phi 80$ ДНК и сходство их генетических карт позволяют конструировать гибриды с помощью простой рекомбинации *in vivo* при сохранении в гибридном геноме всех существенных генов (первый принцип). Эти фаги могут обмениваться структурными генами (включая и *h*-признак, определяющий специфичность к клетке-хозяину), блоком интеграционных генов с *att*-сайтом, областью иммунитета, а также областью *QSR*, отвечающей за лизис клетки.

Однако не всегда рекомбинации приводят к образованию жизнеспособных гибридов. Это объясняется тем, что жизнеспособность фагов определяется не только наличием в геноме всех существенных генов, но и регуляторными взаимоотношениями между ними (второй принцип). Известно, в частности, что продукт гена *N* осуществляет антитерминирующее действие в сайтах *tL1*, *tR1* и *tR2* и что *N*-продукты фагов λ и $\phi 80$ взаимно незаменимы. Поэтому обязательным условием нормального развития λ - $\phi 80$ гибридов является присутствие в рекомбинантном геноме одновременно гена *N* и *t*-сайтов одного и того же фага. Вот почему гибрид $\phi 80hy42$ с рекомбинацией по гомологичному участку в области гена *O*, разделяющему сайты *tR1* и *tR2*, удалось получить только после удаления *tR2*-сайта с помощью делеции *nin5*.

Второй принцип лежит также в основе создания гибрида $\phi 80\text{hy}43$. Известно, что мутация $c17$ у фага λ , располагающаяся в области y , обеспечивает независимость транскрипции генов O и P от $tR1$ -сайта и конститутивность репликации этого фага, что в сочетании с мутацией обуславливает способность фага $\lambda c1c17$ размножаться на λ -монолизогенах. Совмещение в одном геноме мутаций $\phi 80c1$ и $\lambda c17$ при соблюдении отмеченных условий относительно гена N позволило сконструировать жизнеспособный гибрид ($\phi 80\text{hy}43$), вирулентный только для монолизогенных штаммов с профагом $\phi 80$.

Рекомендации третьего принципа учесть гораздо сложнее, поскольку отсутствует необходимая информация. Поэтому вопросы структурного соответствия тех или иных белков разных организмов, выполняющих совместно одну функцию, решаются опытным путем. Предполагалось, например, что эффективный морфогенез фаговых частиц осуществляется лишь в том случае, если все гены и соответственно белки головки, а также отростка принадлежат одному фагу. Однако путем рекомбинации λ и $\phi 80$ ДНК в некоторых определенных участках структурных генов были получены жизнеспособные гибриды типа $\lambda h80imm\lambda$. Следовательно, из конкретных комбинаций белков, относящихся к различным фагам, можно собрать и фаговые головки (гибрид $\lambda[Nu1-D]h80imm\lambda$), и отростки (гибрид $\lambda[Nu1-H]h80imm\lambda$).

При соблюдении принципов геномного конструирования удастся получить жизнеспособные гибриды даже между отдаленными фагами. Так были выделены гибриды фагов λ и P22, которые, несмотря на сходство в строении геномов, отличаются следующими свойствами.

1. Кольцевая λ ДНК образуется из линейной благодаря наличию на концах последней односторонних комплементарных последовательностей. У P22 ДНК этот процесс идет вследствие рекомбинации между концевыми повторами.

2. Фагу λ свойствен длинный отросток с нитью, а у фага P22 он короткий и имеет базальную пластинку.

3. Лизогения у фага λ контролируется одной областью иммунитета, у фага P22 — двумя.

4. Фаги имеют различные клетки-хозяева (λ — *E. coli*, P22 — *S. typhimurium*).

Указанные различия столь существенны, что в гибридах ни одна функция не оказалась рекомбинантной, наблюдались лишь их комбинации. Например, у гибридов *imm λ hP22* и *immP22h λ* ранние и поздние функции фагов λ и P22 сочетаются в любой комбинации.

Одноклеточные организмы

Современный уровень знания допускает возможность создания клеток новых видов только путем радикальной модификации избранного родительского типа или путем создания межвидовых гибридов. Согласно принципам геномного конструирования создание жизнеспособных гибридов практически возможно только между эволюционно близкими организмами. У бактерий первые межвидовые гибриды были получены при скрещивании клеток *E. coli* и *S. typhimurium*. ДНК этих организмов обладают высокой степенью физической гомологии, а расположение генов на их генетических картах совпадает в 85 % случаев. Различные гибриды *E. coli*-*S. typhimurium* содержат разные комбинации генов родительских организмов. Поэтому их фенотипы различаются. Такие гибриды представляют собой удобный объект для генетических исследований. Например, фаг λ не развивается в клетках *S. typhimurium*, но инфицирует ряд гибридов, которые унаследовали от клеток *E. coli* гены *lamB* и *rep*, обеспечивающие его адсорбцию и репликацию. С помощью этих гибридов было обнаружено, что в геноме *S. typhimurium* имеется сайт *att λ* .

Первые гибриды *E. coli*-*S. typhimurium* и другие бактериальные межродовые и межвидовые гибриды получали традиционным генетическим методом — конъюгацией. Однако при этом обмен генами между клетками, относящимися к разным семействам, практически не происходит. Неограниченные возможности для объединения геномов, включая и геномы эволюционно далеких организмов, открывает техника слияния протопластов в присутствии полиэтиленгликоля. При межвидовой и межродовой гибридизации бактерий и дрожжей таким способом удается

получать жизнеспособные гибриды. Но уже здесь проявляется очевидная закономерность: чем отдаленнее скрещиваемые виды, тем реже образуются стабильные гибриды. В гибридах дрожжей обычно остается полный набор хромосом того или иного родителя и одна или несколько хромосом другого партнера. Сходная картина наблюдается и у бактериальных гибридов — они содержат практически полные геномы одного из родителей с интегрированными фрагментами ДНК другого. Причина этого ясна. Принципы геномного конструирования являются фактически правилами, которым следует природа. Поэтому более жизнеспособными оказываются те межвидовые и межродовые гибриды, которые сохраняют большую часть генома одного из родителей.

Многоклеточные организмы

В этом разделе можно сослаться только на примеры геномной инженерии растений. Пластичность растений позволяет манипулировать их геномами и даже получать искусственно новые виды. Такие задачи издавна решались в опытах по межвидовой гибридизации. В частности, крупным достижением генетики и селекции стало создание плодовых растительных гибридов — амфидиплоидов половым путем. На счету клеточной и геномной инженерии получение плодовых растительных гибридов путем слияния протопластов соматических клеток (см. гл. 5).

Геномная инженерия растений значительно расширяет возможности селекционной работы в плане создания таких гибридов, которые нельзя получить традиционными методами. Однако круг организмов, для которых разработаны способы регенерации целых растений из отдельных клеток, ограничен. В их число пока не входят основные пищевые и технические культуры, представляющие главный интерес для человека.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОВТОРЕНИЯ И ОБСУЖДЕНИЯ

14.1. Проиллюстрируйте на примере гибридов лямбдоидных бактериофагов принципы геномного конструирования.

14.2. Пользуясь материалом гл. 4, обсудите свойства фазмид Р1 и N15 как объектов природной геномной инженерии.

Глава 15

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Генетическая инженерия стала эффективным средством анализа структуры и функций генов. Теперь нет необходимости строить гипотезы о возможных проявлениях или последствиях тех или иных мутаций. Можно сконструировать любой наперед заданный, мутантный или рекомбинантный ген, ввести его практически в любой хромосомный локус любого организма и наблюдать эффект на уровне клеток или организма. Генетическая инженерия позволила добиться прогресса в решении фундаментальных проблем не только в генетике, но и в других областях биологии.

Не менее значимы успехи генетической инженерии в прикладных аспектах. В традиционных областях биотехнологии — фармацевтической и пищевой промышленности, в медицине и сельском хозяйстве, в технической микробиологии активно внедряются методы молекулярной биотехнологии. Генетическая инженерия, без сомнения, сыграет революционизирующую роль также в химической промышленности, энергетике и в охране окружающей среды (табл. 15.1).

Наиболее тесно генетическая инженерия связана с белковой инженерией.

Таблица 15.1

Перспективы использования генетической инженерии в различных областях промышленности

Биопродукты или процессы	Применение
Фармацевтическая промышленность	
Ароматические вещества	Анальгетики, наркотики и т.п.
Стероидные гормоны, аминокислоты, витамины	Лечение и профилактика различных заболеваний
Антибиотики, их модификация	Борьба с инфекционными заболеваниями

Продолжение табл. 15.1

Биопродукты или процессы	Применение
Короткие пептиды	Контроль системы кровообращения
Пептидные гормоны	Лечение нарушений метаболизма
Ферменты	Диагностические и терапевтические процедуры
Вирусные антигены	Вакцины
Другие белки	Терапевтические средства: человеческие интерферон, серумальбумин и др.
Индивидуальные гены	Лечение наследственных заболеваний
Пищевая промышленность	
Аминокислоты, витамины, короткие пептиды, ароматические и алифатические вещества	Ароматизирующие и пищевые добавки
Ферменты	Технологические процессы
Переработка целлюлозы	Производство сахара
Короткие пептиды	Искусственные подсластители
Сельское хозяйство	
Аминокислоты, витамины	Кормовые добавки
Антибиотики	Кормовые добавки, профилактика заболеваний
Короткие пептиды	Кормовые добавки, факторы роста
Вирусные антигены	Вакцины
Инсектициды	Борьба с насекомыми-вредителями
Фиксация азота	Удобрения, новые симбиотические системы
Биодеградация	Удаление органического фосфата
Трансгенные растения	Устойчивость к засухе, повышенным концентрациям солей и гербицидов, вирусным и грибковым заболеваниям и т.п.; улучшение вкуса, питательной ценности, сроков хранения и др.
Химическая промышленность	
Ароматические и алифатические вещества	Промежуточные продукты химических технологий

Продолжение табл. 15.1

Биопродукты или процессы	Применение
Ферменты	Технологические процессы
Выщелачивание минералов	Экстракция металлов
Биодеградация	Удаление органического фосфата и арилсульфонатов
Энергетика	
Ферменты	Технологические процессы
Биодеградация	Удаление побочных продуктов и отходов нефтяной промышленности
Переработка сточных вод и твердых отходов	Производство метана
Переработка целлюлозы	Производство этанола
Выщелачивание минералов	Концентрирование урана и других металлов
Переработка угля	Производство метана
Биофотоллиз	Производство водорода
Биологическая азотфиксация	Производство удобрений без энергоемких процессов
Камеди	Регенерация нефтепродуктов
Синтез химреактивов	Замена нефтепродуктов на биопродукты при производстве органических веществ, например, бутанола и ацетона из крахмала и т.п.
Биомасса	Получение биогаза
Охрана окружающей среды	
Биодеградация	Переработка промышленных вод и твердых отходов. Очистка водных поверхностей от нефтяных загрязнений
Микробные тестовые системы	Контроль за мутагенами среды, за побочными действиями пестицидов, инсектицидов и т.п. Определение следов ядохимикатов и других загрязнений
Биологические средства защиты растений	Защита почв и вод от солевых и других загрязнений. Сохранение биоценоза

Белковая инженерия

Белковая инженерия зародилась на стыке физики и химии белка и генетической инженерии. Она решает задачу создания модифицированных или гибридных молекул белков с заданными характеристиками. Естественным путем реализации такой задачи является предсказание структуры гена, кодирующего измененный белок, осуществление его синтеза, клонирования и экспрессии в реципиентных клетках.

Модификация белков. Простейший путь получения модифицированных белков — сайт-направленный мутагенез исходных генов. Уже в ранних работах по белковой инженерии оказалось возможным по известной пространственной структуре тирозил-тРНК-синтетазы *Bacillus stearothermophilus* предсказать такую точечную мутацию в ее гене, которая должна привести к увеличению сродства фермента к АТР. В результате проведенной замены одной аминокислоты сродство удалось увеличить в сто раз (Wilkinson *et al.*, 1984). С помощью аналогичного подхода в лизоциме фага Т4 удалось образовать дисульфидную связь и тем самым увеличить его термостабильность (Perry, Wetzel, 1984). Также путем направленной аминокислотной замены была повышена растворимость и всасывание инсулина при его терапевтических концентрациях (Brange *et al.*, 1988). Последовательные замены в структуре субтилизина *B. subtilis* позволили увеличить его скорость катализа и стабильность в органических растворителях, изменить субстратную специфичность и оптимум pH, повысить устойчивость к химическому окислению, а также к термической и щелочной инактивации.

В случаях, когда известно, какую аминокислоту надо заменить, но не ясно — на какую, применяют метод случайного мутагенеза данного кодона (Reidhaar-Olson, Sauer, 1988), как это описано в гл. 8.

Конструирование гибридных белков. Получение гибридных (слитых) белков — стандартная задача генетической инженерии, ставящая целью экспрессию, секрецию, детекцию или очистку целевого белка (см. гл. 10). В контексте белковой инженерии

речь идет о создании белков, которые состоят из комбинации функциональных доменов, взятых у родственных или различных белков, и обладают полезными технологическими или медицинскими свойствами. Такая возможность основана, во-первых, на том, что в природе сходные биологические функции у разных организмов обеспечиваются белками, проявляющими самые разнообразные физико-химические и биологические свойства. Во-вторых, известно, что у многих полифункциональных белков функциональные домены действуют независимо друг от друга, так как они организованы в структурные домены.

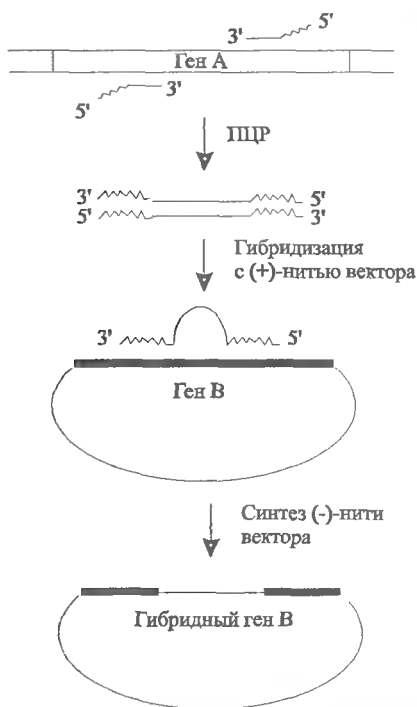


Рис. 15.1. Последовательные этапы замены домен-кодирующего участка гена *В* на участок гена *А* с помощью метода ПЦР.

Волнистые линии в праймерах — последовательности, комплементарные к концам замещаемого домена в гене *В*; ген *В*, клонированный в однонитевом векторе, выделен жирной линией

Обмен доменами удобно проводить с помощью метода ПЦР (Clackson, Winter, 1989). Для этого синтезируют праймеры, комплементарные к границам переносимого домен-кодирующего

участка гена *A*, причем на их 5'-концах предусматривают последовательности, комплементарные к концам замещаемого домен-кодирующего участка гена *B* (рис. 15.1). Эти последовательности сохраняются в получающемся дуплексе (см. приложение). Ген *B* клонируют в одонитевом векторе, что позволяет одной из нитей дуплекса связаться с ним и образовать своеобразный шунт замещаемому домен-кодирующему участку. Нить дуплекса служит праймером для копирования основной части вектора. В результате синтезируется комплементарная нить вектора, которая содержит ген *B* с замещенным домен-кодирующим участком.

Примером успешного обмена функциональными доменами, взятыми у родственных белков, служат эксперименты по получению методом рекомбинации *in vitro* и *in vivo* гибридных α -интерферонов человека (Stebbing, May, 1982) и мыши (Zwarthoff *et al.*, 1987). Некоторые варианты гибридных белков имели существенно большую противовирусную активность, чем родительские формы. Два различных белка — человеческие γ -интерферон и интерлейкин-2, объединенные в один полипептид, проявляли в нем обе активности (Seno *et al.*, 1986). Этот результат позволяет ставить вопрос о создании белковых лекарственных препаратов комбинированного действия.

Интересен пример конструирования рестриктазы, специфичной к Z-ДНК (Kim *et al.*, 1997). В этой работе нуклеазный домен рестриктазы *FokI* был “сшит” с доменом Z- α из N-терминальной области человеческой аденозиндеаминазы двунитевой РНК (*hADAR1*). В результате была создана конформационно-специфическая эндонуклеаза, расщепляющая только такие плазмиды с отрицательной суперскрученностью, которые содержат Z-ДНК, например вставку (dC-dG)₁₃.

К категории гибридных белков относятся также искусственные рецептор-опосредованные токсины, включая иммунотоксины. Многие бактериальные полипептидные токсины состоят из двух компонентов — активной субъединицы *A* и субъединицы *B*, узнающей клеточный рецептор и позволяющей

токсину проникнуть в клетку. При замене субъединицы В на какой-либо другой лиганд токсин приобретает другую специфичность. Например, объединение в одном полипептиде субъединицы А дифтерийного токсина и меланоцитстимулирующего гормона α человека позволило создать препарат, токсичный для клеток меланомы (Murphy *et al.*, 1986). Многообещающими в медицине благодаря своим разнообразию и специфичности могут стать иммунотоксины, представляющие собой иммуноглобулины, ковалентно связанные с полипептидными токсинами.

Идеи белковой инженерии нашли свое воплощение в современных экспрессионных векторах, например pсDNA3.1 (см. рис. 13.7). Они содержат комплекс дополнительных генетических элементов, позволяющих так направленно изменять целевой белок, что существенно облегчается поиск необходимых клонов (маркирование белка эпитопами) и очистка продукта (введение в белок высокоафинных к металлам сайтов типа His₆ или 3'-концевой полиаргининовой цепочки). Последняя придает белку основные свойства, что дает возможность хроматографически выделять его из суммарного белка. В образующихся белках предусматривают также сайты для отщепления целевого белка от гибридного.

Искусственные белки. Основываясь на теории белковых структур, можно конструировать белки с новой, т. е. не обнаруженной до сих пор в природе архитектурой. Первым таким белком стал альбебетин, состоящий из двух повторяющихся элементов $\alpha\beta$ (Финкельштейн *и др.*, 1988). Его исследование показало, что практически он так же компактен, как и природные глобулярные белки сходной молекулярной массы, и имеет относительно стабильную структуру. Затем в него был введен биологически функциональный фрагмент из восьми аминокислот, обладающий бласт-трансформирующей активностью интерферона (Долгих *и др.*, 1993). Модифицированный альбебетин имел высокое сродство к рецепторам тимоцитов мыши и активировал реакцию их бласт-трансформации даже эффективнее, чем интерферон.

Вакцинные препараты. Своевременная вакцинация защищает людей и животных от инфекционных заболеваний. Однако существует ряд причин, из-за которых далеко не против всех инфекций имеются надежные вакцины. Живые вакцины более эффективны, чем инактивированные, поскольку они размножаются в организме и включают все компоненты иммунной системы. Но для этого не всегда удастся выделить аттенуированные (с ослабленной патогенностью) штаммы, этому иногда мешает высокая антигенная изменчивость инфекционных агентов (вирус гриппа, ВИЧ), встречаются трудности их культивирования (вирус гепатита В) и т. п. Поэтому ведется настойчивая работа по приготовлению генно-инженерных вакцин (см. обзор Dertzbangh, 1998).

Простейшим вариантом являются молекулярные вакцины, т. е. индивидуальные иммуногенные белки (например, поверхностные белки вирусов) и даже отдельные эпитопы (10–15 аминокислотных остатков), синтезированные с помощью методов клонирования и экспрессии. Действительно, по структуре гена в молекуле белка можно выявить непрерывные аминокислотные последовательности, определяющие его антигенную активность. Многие вирусные белки и эпитопы были синтезированы и испытаны для вакцинации животных, но их иммуногенный эффект был слабым. Более перспективным направлением оказалось использование живых вакцинных штаммов, как, например, БЦЖ (Stover *et al.*, 1991), вируса осповакцины и аденовируса (см. гл. 13), с помощью которых клонировали и экспрессировали чужеродные для них гены иммуногенных белков. Можно упомянуть также опыты по использованию для этой же цели аттенуированного штамма *S. typhimurium* (Hackett, 1993), который, будучи пищевым патогеном, привлекателен тем, что может вводиться орально.

Перспективным для целей иммунизации может оказаться метод фагового дисплея, позволяющий выставлять на поверхности вирионов целевые эпитопы (см. гл. 10). Но настоящим прорывом являются ДНК-вакцины (см. обзор Дебабова, 1997).

Открытие факта иммуногенности рекомбинантных плазмид, кодирующих белок-антиген и введенных в организм просто внутримышечной или подкожной инъекцией, оказалось неожиданной удачей (Wolff *et al.*, 1990; Tang *et al.*, 1992). Радикально упрощается методология иммунизации. Хотя при этом трансфицируется очень мало клеток, количество синтезированного белка оказывается достаточным для развития удивительно сильного иммунного ответа, гуморального и клеточного (Ulmer *et al.*, 1993; Davis, Whalen, 1995). Не требуется никакой адъювант, сама ДНК играет его роль. Каким-то образом синтезированные белки эффективно доставляются к антиген-представляющим клеткам. Если необходима комбинация нескольких антигенов, то достаточно при инъекции вводить смесь соответствующих рекомбинантных плазмид. Экспериментальные испытания на животных прошли ДНК-вакцины против гриппа, гепатита В и С, бешенства, туберкулеза, коклюша, вируса иммунодефицита человека и других инфекционных заболеваний.

Преимущества ДНК-вакцин: 1) ими легче манипулировать, чем другими типами вакцин; 2) различные плазмиды, кодирующие разные антигены, готовят одинаковым образом; 3) из-за стабильности ДНК ее хранение и транспорт не представляют сложности; 4) существенно облегчается возможность модификации структуры белка-антигена, вплоть до встраивания в него гетерологичных эпитопов.

Микроорганизмы

Описание штаммов микроорганизмов, несущих рекДНК и синтезирующих различные препараты полипептидной природы, содержится во многих главах книги. Генная инженерия сделала также возможным вмешательство в метаболические пути микроорганизмов с тем, чтобы заставить их синтезировать низкомолекулярные вещества промышленного назначения. В этом перечне значатся краситель индиго (Murdock *et al.*, 1993), пигмент меланин (Della-Coppa *et al.*, 1990), витамин С (Lazarus *et al.*, 1990), новые антибиотики (см. обзор Hopwood, 1993). Сконструирова-

ны штаммы *S. cerevisiae*, существенно сокращающие сроки созревания пива (Suihko *et al.*, 1990) и обладающие лучшими пеккарскими свойствами (Rogers *et al.*, 1990).

Ведутся работы по созданию генно-инженерных штаммов почвенных бактерий, в частности, азотфиксирующих ризобий, с повышенной конкурентоспособностью и симбиотической эффективностью. Уже осуществлен выпуск в среду многих таких штаммов.

Растения

В сельском хозяйстве за последние десятилетия селекционные методы позволили получить культуры с повышенной урожайностью и устойчивостью к вредителям, с улучшенными питательными качествами. Селекция сохранит свое значение и в будущем, но все более существенную роль будет играть сочетание методов генетической и клеточной инженерии, что позволит значительно ускорить прогресс в создании модифицированных или новых видов полезных сельскохозяйственных растений. Как уже упоминалось, растения, выращенные из изолированных клеток, часто отличаются по генотипу от растений, из которых эти клетки были взяты, что облегчает поиск линий с улучшенными агрономическими свойствами. Причем в отдельных случаях отбор можно вести на уровне клеток, не ожидая регенерации из них целых растений.

Успехи генной инженерии растений в прикладных аспектах развиваются по нарастающей. На первом этапе были получены трансгенные растения с полезными моногенными (устойчивость к гербицидам или вирусам) и даже мультигенными признаками. Следующим этапом было создание растений с улучшенными вкусовыми и питательными характеристиками и улучшенными товарными свойствами. На очереди использование растений в качестве фабрик для синтеза фармацевтических и химических продуктов.

Насекомые, грибы, сорняки и вирусы — природные враги культурных растений. Для борьбы с ними традиционно используют химические методы, которые, как правило, неселективны,

дорогостоящи и экологически небезопасны. Генетическая инженерия предложила альтернативные методы.

От насекомых особенно страдают картофель, кукуруза и хлопчатник. Большим успехом было введение в практику природных инсектицидов — токсинов белковой природы, вырабатываемых бактериями *Bacillus thuringiensis*. Они дают до 90 % биопестицидов, используемых в настоящее время. В каждой клетке накапливается свыше миллиона молекул токсина, поэтому они образуют кристаллы. Гены токсинов *cry* локализуются на плазмидах. Разные штаммы синтезируют токсины разной специфичности, безвредные для позвоночных и полезных насекомых. Наиболее широко они используются против гусениц чешуекрылых насекомых путем распыления препарата на полях. Конечно, его действие непродолжительно, поскольку он смывается с растений. Введение гена токсина в трансгенные помидоры, табак и хлопок позволило получить устойчивые к насекомым растения, которые хорошо зарекомендовали себя в полевых испытаниях. Кроме использования растительной экспрессионной кассеты, для этого пришлось провести “эукариотизацию” гена, т. е. заменить в нем неоптимальные для растений кодоны на оптимальные, модифицировать некоторые последовательности, дестабилизирующие мРНК и т. д. (Carozzi *et al.*, 1992).

Разрабатываются способы борьбы с патогенными грибами. Успешным оказался опыт по защите трансгенных помидоров и рапса от *Rhizoctonia solani* с помощью хитиназы бобов, ген которой был введен в растения (Broglié *et al.*, 1991).

Сорняки губят до 70 % урожая, конкурируя за влагу, свет и питательные вещества. Используемые для борьбы с ними гербициды блокируют реакции, присущие большинству растений, поскольку сорняки представлены многими видами. В какой-то степени страдают от них и сами выращиваемые культуры. Чтобы сделать их устойчивыми к гербицидам, используют два подхода: их молекулу-мишень делают нечувствительной для гербицида (например, путем ее перепроизводства), либо в растение вводят ген, продукт которого разрушает или модифицирует гербицид.

Примером первого подхода является создание петунии, устойчивой к глифосату (Shah *et al.*, 1986). Этот гербицид ингибирует 5-енол-пирувилшикимат-3-фосфатсинтазу, ключевой фермент синтеза ароматических аминокислот в растениях и бактериях. На клеточном уровне была отобрана линия, устойчивая к глифосату благодаря мультипликации синтазного гена. Этот ген под контролем промотора каулимовируса был введен в растение. В трансгенных петуниях мультиплицированный ген экспрессировался в хлоропластах, существенно повышая устойчивость растений к глифосату.

Эффективность второго подхода была продемонстрирована на примере создания культур, устойчивых к фосфинотрицину. Этот гербицид необратимо ингибирует глутаминсинтетазу у растений и бактерий. Стрептомицеты *Streptomyces hygroscopicus* способны инактивировать фосфинотрицин путем его ацетилирования. Их ген *bar*, кодирующий ацетилазу, с помощью агробактерий был введен в картофель, табак и помидоры. Полученные трансгенные растения успешно прошли полевые испытания на устойчивость к фосфинотрицину (De Greef *et al.*, 1989).

Разрабатываются разные подходы для создания растений, устойчивых к вирусам (Fitchen, Beachy, 1993), но наиболее универсальным методом остается получение трансгенных растений, содержащих ген оболочечного вирусного белка. В таких растениях развитие родственных вирусов существенно замедляется, что впервые было показано для табака и томатов, подверженных инфекции вирусом табачной мозаики (Powell-Abel *et al.*, 1986).

Антисмысловые РНК были использованы для увеличения сроков хранения помидоров путем подавления синтеза полигалактуроназы (Sheehy *et al.*, 1988) и фитогормона этилена (Oeller *et al.*, 1991), вовлеченных в процесс их созревания и размягчения.

Интересные опыты ведутся по изменению пищевой ценности растений в тех случаях, когда известны генетика и биохимия того или иного процесса. Например, вмешательством в генотип удастся менять качество крахмала, изменяя относительное содержание двух его главных компонентов — амилозы (линейный полимер) и амилопектина (ветвистый полимер).

Можно модифицировать спектр синтезируемых растением жирных кислот, направляя их использование для пищевых или промышленных целей.

Выращивание растений не требует специального оборудования и дорогих химпрепаратов, поэтому растительные продукты относительно дешевы. По этой причине ведутся работы по использованию трансгенных растений в качестве “фабрик” для производства специализированных веществ, например, животных белков медицинского назначения (интерферон, энкефалины, сывороточный альбумин, иммуноглобулины и т. п.).

Трансгенные растения уже вышли из лаборатории. В 1994 году впервые на рынке появились томаты, которые остаются твердыми многие недели после их сбора. Прошли полевые испытания устойчивые к гербицидам табак, хлопок, картофель, помидоры, кукуруза, свекла, рапс, салат-латук и др. Главный вопрос, который при этом ставился — впишутся ли они в экосистему? Будут ли они вытеснять другие виды или будут сами вытеснены? Это не только вопрос их устойчивости, но также их влияния на окружение. Например, рапс с геном хитиназы устойчив к грибным патогенам, но не будет ли хитиназа токсичной для пчел? В этом случае было показано, что нет, а многие другие вопросы остаются пока без ответа. К примеру, не перенесется ли ген устойчивости от полезного растения к какому-нибудь сорняку или паразиту, скажем, через пыльцу, вирус или микроб?

Животные

Наиболее полезным в практическом плане применением генной инженерии животных явилось создание линий трансгенных мышей, моделирующих наследственные заболевания человека — атеросклероз, болезнь Альцгеймера, саркому Капоши, мышечную дистрофию и др. Эти животные были использованы для разработки и испытания средств борьбы с такими заболеваниями. Интересен метод использования трансгенных мышей для тестирования *in vivo* мутагенности разных химических соединений (Kohler *et al.*, 1990). Тестерный ген *lacZ* был введен в мышь с

помощью λ вектора. После действия мутагена из разных тканей мыши выделяли геномную ДНК, а из нее методом упаковки в фаговую головку *in vitro* “спасали” векторную ДНК. Рассев фагов на газон клеток *E. coli lacZ*⁻ с использованием среды Xgal позволял по отношению числа бесцветных негативных колоний к голубым (см. гл. 7) определять частоту мутаций.

Попытки вмешательства в геном сельскохозяйственных животных и птиц имели пока ограниченный успех. Можно упомянуть только о создании трансгенных цыплят, устойчивых к вирусу лейкоза птиц (Salter, Critten, 1988). В их геном был введен экспрессирующийся ген оболочечного гликопротеина этого вируса. Многочисленные попытки введения в ДНК домашних животных генов гормона роста разного происхождения не привели к заметному экономическому эффекту. Например, у трансгенных свиней наблюдалось значительное увеличение дневного привеса и уменьшение жирности мяса, причем эти характеристики сохранялись в ряду поколений. Но, с другой стороны, многие животные страдали от различных заболеваний и обладали пониженной фертильностью. Вывод из результатов этих экспериментов очевиден: необходимо поставить экспрессию вводимых генов под приемлемый для поставленной цели контроль. Это, конечно, потребует проведения фундаментальных исследований молекулярной физиологии каждого вида животных.

Активно разрабатывается идея создания ферм домашних трансгенных животных, в молоке которых содержатся белковые препараты медицинского назначения. Молочные железы являются идеальным “ферментером” для производства таких препаратов, поскольку: 1) продукт модифицирован должным образом; 2) находится вне клеток в жидкой фазе в достаточно высокой концентрации; 3) стерилен. Конечно, вводимый ген должен быть подчинен тканеспецифическому промотору. Так, с помощью гена α_1 -антитрипсина ААТ, поставленного под контроль промотора гена β -лактоглобулина, были получены трансгенные овцы, в молоке которых содержится до 35 г/л этого белка (Wright *et al.*, 1991). α_1 -антитрипсин является ингибитором

протеазы эластазы. Лица, у которых отсутствует этот белок, предрасположены к заболеванию эмфиземой легких и циррозом печени в детском возрасте, так как у них постепенно распадается соединительная ткань. Его внутривенное введение служит для больных лекарственным средством. Аналогичным образом были получены козы, продуцирующие активатор тканевого плазминогена человека tPA (Ebert *et al.*, 1991). Проведены также эксперименты по получению гормонов, факторов роста и коагуляции, антитромбогенных факторов, моноклональных антител, антигенов для вакцинации и диагностики, разных ферментов и т. п.

Получение трансгенных промысловых рыб ведется в трех направлениях: увеличения скорости их развития и прибавки веса путем введения в них генов гормонов роста, повышения их холодостойкости с помощью введенного гена *AFP*, кодирующего белок-антифриз, и придания устойчивости к вирусным заболеваниям с помощью противовирусных антисмысловых РНК (см. обзор Chen, Powers, 1990).

Интересны и перспективны работы по созданию продуцентов белка паутины пауков (Guerette *et al.*, 1996), поскольку прочность на разрыв нитей паутины в расчете на площадь поперечного сечения на порядок превосходит прочность стальных канатов.

Человек

Медицинские аспекты генетической инженерии затрагивают два круга проблем — диагностику заболеваний и генную терапию. Эти практические разработки “подпитываются” данными, получаемыми в результате реализации фундаментальной международной программы “Геном человека”. Вопросы генной терапии были рассмотрены в гл. 13, здесь же коснемся проблем диагностики. Обе проблемы детально освещены в монографии Горбуновой и Баранова (1997).

Существует два вида традиционных реагентов, используемых в диагностике: субстраты для специфических ферментов и антитела для выявления специфических белков. Генная инже-

нерия ввела в практику еще один реагент — нуклеиновые кислоты — зонды для выявления специфических нуклеотидных последовательностей методом гибридизации. Использование метода полимеразной цепной реакции (см. приложение) для мультипликации тестируемой ДНК обеспечивает высокую чувствительность этих зондов. Они применяются, во-первых, в клинической микробиологии для определения патогенных микроорганизмов — бактерий, вирусов и простейших. Метод гибридизации существенно ускоряет проведение анализов, но для этого необходимо иметь набор зондов, специфических для разных видов микроорганизмов. С его помощью можно выявлять микроорганизмы *in situ*, в тканях. Недостатком метода является тот факт, что он не определяет жизнеспособность объектов. Другое применение зондов — диагностика наследственных заболеваний путем нахождения специфических изменений в генах или выявления полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) в заданных генных локусах (см. гл. 9).

Диагностика наследственных заболеваний. Выше отмечалось, что известно около 5000 наследственных заболеваний. Необходимость их пре- и постнатальной диагностики возникает в разных случаях, например, когда оба родителя являются гетерозиготными носителями мутантного гена и есть вероятность, что ребенок унаследует оба рецессивных аллеля. Кроме упомянутых выше традиционных реагентов возможность пре- и постнатальной диагностики зависит от наличия маркеров для патологических генов. Здесь можно выделить три основных подхода. Они применяются в зависимости от того, известен или нет ген, дефект в котором вызвал заболевание, известна ли природа мутации, имеется ли к гену зонд и т. п.

1. В гене есть точечная мутация; имеются зонды к нормальному и мутантному участкам гена. Гибридизационные зонды способны выявлять различия в тестируемых последовательностях, составляющих даже один нуклеотид. Это было продемонстрировано на примере 19-членных олигонуклеотидов, комплементарных к одному и тому же участку нормального и мутантного генов β -глобина (Conner *et al.*, 1983). С их

помощью оказалось возможным различать гомозиготные и гетерозиготные особи. Подобные зонды существуют для фенилкетонурии, дефицита α_1 -антитрипсина и ряда других заболеваний.

Два других подхода связаны с использованием маркеров, определяемых по ПДРФ. Они есть у каждого индивидуума, здорового и больного. Если генетическое заболевание передается потомкам вместе с определенным вариантом ПДРФ, то, значит, мутантный ген сцеплен с ним. Этот вывод позволяет делать соответствующие заключения по итогам пре- и постнатальной диагностики.

2. В гене или рядом с ним мутация удалила существующий или ввела новый сайт рестрикции; имеется зонд к гену. Этот подход иллюстрирует рис. 9.11. Первый случай ПДРФ в геноме человека был выявлен при анализе мутантного гена β -глобина, который в гомоаллельном состоя-

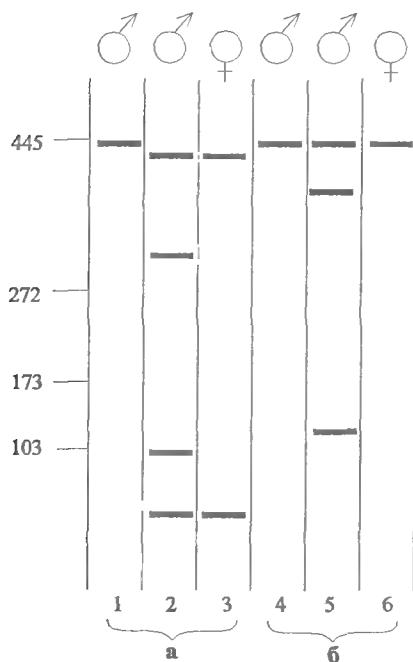


Рис. 15.2. Определение пола плода человека (а) и крупного рогатого скота (б) методом ПДРФ фрагментов генов *ZFX* и *ZFY*.

Дорожки 1 и 4 — исходные фрагменты; 2 и 3 — *HaeIII*-рестрикты; 5 и 6 — *PstI*-рестрикты; слева указаны реперные точки в п.н. Половая принадлежность фрагментов указана наверху

нии приводит к серповидно-клеточной анемии. В негритянской популяции США эта мутация оказалась сцепленной с другой мутацией, локализованной вне гена и удаляющей сайт для рестриктазы *HpaI* (Kan, Dozy, 1978). Нормальный ген обнаруживался в рестрикте длиной 7,6 т.п.н., а мутантный — 13,0 т.п.н.

Этот же подход используется для определения пола на ранних этапах развития плода, что необходимо в случае возможного риска заболевания, сцепленного с полом. У человека на половых хромосомах выявлены высокоомологичные, но не идентичные гены *ZFX* и *ZFY*. С помощью специальных праймеров методом ПЦР были амплифицированы участки этих генов размером 445 (*ZFX*) и 447 (*ZFY*) п.н. Первый фрагмент имеет 1 *HaeIII*-сайт, а второй — 2, так что X и Y хромосомы можно различать по рестриктам длиной 400+45 и 317+84+46 п.н., соответственно (Aasen, Medrano, 1990). Плод мужского пола характеризуется четырьмя рестриктами, а женского — только двумя (рис. 15.2, а). Аналогичные пары генов имеются у всех плацентных млекопитающих, и с помощью тех же праймеров можно амплифицировать сходные участки генов. Для некоторых видов полученные фрагменты ДНК также можно различать по ПДРФ. Например, у крупного рогатого скота фрагмент из Y хромосомы расщепляется рестриктазой *PstI* на два (344+103 п.н.), а фрагмент длиной 445 п.н. из X хромосомы остается неизменным (рис. 15.2, б).

3. Ген неизвестен, неизвестны также и первичные биохимические дефекты. Подход впервые был использован для поиска гена, ответственного за хорею Гентингтона (Gusella *et al.*, 1983). Он характеризует так называемую “обратную генетику”, когда от признака, минуя мРНК и белок, выходят непосредственно на ген. Наиболее трудоемким этапом этого подхода является поиск среди минисателлитных зондов (см. гл. 9) такого, который сцеплен с маркером данного заболевания. Для этого анализируют образцы ДНК, взятые у членов многих охарактеризованных информативных семей. В случае успеха отобранный ПДРФ-маркер применяют для картирования гена, который затем клонируют и анализируют. ПДРФ-маркеры

выявлены и используются для диагностики более ста наследственных заболеваний, включая муковисцитоз, мышечную дистрофию Дюшенна, болезнь Альцгеймера и др.

В качестве примера рассмотрим случай, когда клинические проявления некоторой наследственной болезни удалось связать с полиморфным маркером, обусловленным повторами (рис. 15.3,а). Супруги здоровы, но у их родственников болезнь наблюдалась, поэтому они обеспокоены судьбой своего будущего ребенка. Анализ образцов ДНК, взятых у членов их се-

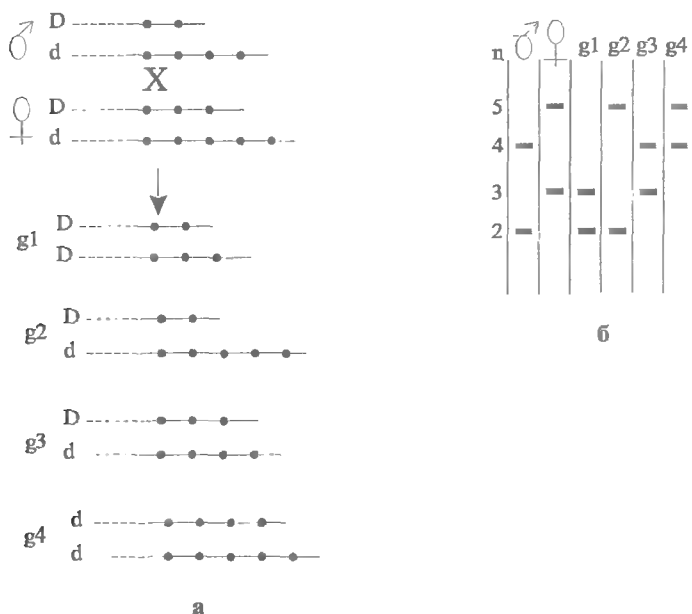


Рис. 15.3. Диагностика наследственного заболевания, вызванного рецессивной мутантной аллелью d неизвестного гена d : а — строение аллельных рестриктов в ДНК родителей и возможные варианты рестриктов их ребенка; б — картина блотинга по Саузерну тех же рестриктов.

Жирная точка — повтор; n — число повторов; g — возможные варианты генотипов

мей, позволил установить точную длину рестрикта, сцепленного с рецессивной мутантной аллелью d в каждой семье (в нашем примере — 4 и 5 повторов). Оба супруга оказались гетерозиготами по признаку носительства этой аллели. Варианты ПДРФ для их ребенка представлены на рис 15.3,б. Рекомендация к прерыванию беременности будет дана в случае варианта g4. Если супруги являются родственниками, то с большой вероятностью их аллели d будут одинаковыми.

Следует принимать во внимание вероятностный характер выводов, присущих рассматриваемому подходу. Несмотря на сцепленность ПДРФ-маркера с мутантной аллелью не исключена рекомбинация между гомологичными хромосомами в анализируемой области, что может привести к ошибке в диагнозе.

Геномная дактилоскопия. Гибридизационные зонды к минисателлитам стали эффективным средством в так называемой геномной дактилоскопии, т.е. метода выявления индивидуальных различий и особенностей у людей на уровне структуры ДНК (Jeffreys *et al.*, 1985). Метод основан на явлении ПДРФ. Как уже отмечалось, минисателлиты в определенных локусах у разных не родственных особей отличаются по длине (числу tandemных повторов), что может быть выявлено с помощью блотинга по Саузерну, в котором зондами служат клонированные участки минисателлитов.

Один зонд позволяет наблюдать одновременно за наследованием нескольких десятков минисателлитов, расположенных в разных локусах, но относящихся к одному семейству. В среднем разрешению и учету поддаются приблизительно 20 фрагментов размером более 3 т.п.н. Поскольку каждый из локусов полиморфен (как правило, более шести вариантов), а локусы независимы друг от друга, то образующийся набор полос специфичен для каждого индивидуума (вероятность совпадения картин у двух не родственных лиц равна приблизительно 10^{-11}) и является его геным “отпечатком пальцев”. При использовании двух разных зондов названная вероятность совпадения ничтожно мала. Поэтому геномная дактилоскопия стала широко применяться в области криминалистики и судебно-медицинской экспертизы.

Гипервариабельные участки, содержащие множественные повторы, имеются и в митохондриальной ДНК. Анализ амплифицированных участков этой ДНК позволил идентифицировать останки Николая II и его семьи (Gill *et al.*, 1994).

Любопытно, что оказалось возможным использовать ДНК фага M13 в качестве универсального зонда для геномной дактилоскопии различных живых существ. Это вызвано наличием в фаговом гене III двух GC-богатых повторов. С помощью клонированного фрагмента этого гена, содержащего один из повторов, выявлено универсальное семейство гипервариабельных последовательностей, встречающееся у организмов различной таксономической принадлежности, от прокариот и низших эукариот до высших растений и животных, включая человека (Джинчарадзе и др., 1987; Vassart *et al.*, 1987). Это открывает новые возможности для генотипирования организмов, маркирования индивидуальных хромосом и генов, изучения генетической структуры популяций, эволюционных исследований, паспортизации пород, сортов и штаммов микроорганизмов и т. п.

ДНК как медицинский продукт. Успехи в изучении генома человека и появление возможности использования генов в лечебных целях привели к созданию многих биотехнологических фирм, специализирующихся в обслуживании генной терапии. Одни занимаются идентификацией генов, другие разрабатывают методы переноса и экспрессии генов в клетках пациента, третьи готовят антисмысловые РНК как средство подавления нежелательной экспрессии генов и т.д. Эксперты предсказывали проведение первых коммерческих операций по генной терапии к концу этого века. Но пока ни один продукт для генной терапии не коммерциализирован, хотя сделаны сотни клинических экспериментов. В большинстве из них получены обнадеживающие результаты, но эффективность и безопасность продемонстрирована далеко не всегда. Остаются и этические проблемы.

Сказанное можно отнести и к ДНК-вакцинам (см. с. 448).

Другие проблемы

Ряд проблем, в решении которых большие надежды возлагаются на генетическую инженерию, носит комплексный характер.

К ним относится проблема повышения плодородия почв. Использование для этих целей удобрений, главным образом азотистых, не дает желаемого эффекта по двум причинам. Во-первых, химический синтез азотистых удобрений идет с помощью энергоемкого и дорогостоящего процесса. Во-вторых, для создания в почве нужной концентрации удобрений их вносят в избытке и они в значительном количестве вымываются, что приводит к загрязнению водоемов и к экологическим сдвигам в окружающей среде. В связи с этим генетической инженерии предстоит разработать способы использования биологической системы фиксации азота для обеспечения солями аммония сельскохозяйственных культур. Возможны несколько вариантов решения этой задачи: применение свободно живущих бактерий, фиксирующих азот, или изолированной модифицированной нитрогеназы (фермент, ведущий биологическую азотфиксацию) в промышленном производстве аммиака; повышение эффективности природных азотфиксирующих бактерий-симбионтов и разработка новых симбиотических ассоциаций; введение генов азотфиксации (*nif*-генов) в культурные растения и др. Конечно, предварительно нужно провести работу по выяснению механизмов симбиотических взаимоотношений, разработке способов защиты нитрогеназы от действия кислорода, по расшифровке систем регуляции нитрогеназы и т. п. В решении таких фундаментальных проблем тоже ожидается помощь от генетической инженерии.

Комплексный характер носит и проблема использования промышленных, сельскохозяйственных и бытовых отходов, накапливающихся в огромных количествах в развитых странах. И здесь биотехнология с помощью специально сконструированных микроорганизмов обеспечит превращение части этих отходов в продукты, которые сейчас получают из нефти. Это один из путей, предлагаемых генетической инженерией для решения проблемы, возникающей в связи с исчерпанием в мире невозобновляемых источников энергии. Параллельно при этом будет решаться задача по охране окружающей среды. Уже в настоящее время для получения микробного кормового

белка используют п-алканы, содержащиеся в побочных продуктах очистки нефти; метан, выделяющийся из нефтяных месторождений; метанол, получаемый из этого метана, и т. д. В том же плане широкий резонанс вызвал бразильский эксперимент по производству этанола из сахарного тростника и маниоки и использованию полученного спирта в качестве топлива для автомобилей. На основании результатов данного опыта в некоторых странах приступили к разработке методов превращения в жидкое или газообразное топливо промышленных отходов.

В целом можно подчеркнуть, что генетическая инженерия способна оказать серьезное влияние на многие отрасли народного хозяйства. Биологизация производства — это завтрашний день технологии, и решающее значение здесь будет принадлежать генетической инженерии.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОВТОРЕНИЯ И ОБСУЖДЕНИЯ

15.1. Предложите план эксперимента по объединению в одном полипептиде двух функциональных доменов разных белков.

15.2. Как можно изменять специфичность действия токсинов?

15.3. Опишите подходы к созданию генно-инженерных вакцинных препаратов. Каковы преимущества ДНК-вакцин?

15.4. В каких прикладных аспектах развивается молекулярная биотехнология микроорганизмов?

15.5. Охарактеризуйте преимущества и недостатки химических и генно-инженерных методов защиты культурных растений.

15.6. Какие практические задачи можно решать, используя трансгенных животных и рыб?

15.7. В каких случаях используют метод “обратной генетики” при диагностике наследственных заболеваний?

15.8. Как определяют пол плода на ранних этапах его развития?

15.9. На чем основана геномная дактилоскопия? Может ли она служить генным паспортом человека?

15.10. Обсудите возможности генетической инженерии в решении экологических проблем.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Гель-электрофорез

Молекулы ДНК отрицательно заряжены, поэтому в электрическом поле они движутся от отрицательного полюса к положительному, сворачиваясь в глобулы. В свободном растворе электрофоретическая подвижность глобул не зависит от их молекулярного веса. Однако в гелевой среде, состоящей из пор, молекулы ДНК разного размера тратят разное время на преодоление пор, так что скорость их миграции сквозь гель (при напряженности поля, не превышающей 5 В/см) становится обратно пропорциональной логарифму числа нуклеотидных пар в ДНК (Aaij, Borst, 1972).

Скорость движения в геле молекул ДНК определенного размера зависит от их конформации. В стандартных условиях суперскрученные кольцевые молекулы движутся быстрее никированных кольцевых молекул, последние в свою очередь обгоняют линейные фрагменты ДНК. В редких случаях порядок следования этих форм ДНК обратен.

В качестве гелеобразующего вещества используют линейный полимер агарозу или полиакриламид. Агарозные гели готовят путем растворения агарозы в подходящем буфере. Полиакриламидные гели готовят, полимеризуя акриламид ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) в присутствии персульфата аммония, NNN'-тетраметилдиамина (TEMED, инициатор линейной полимеризации) и N'-N'-метиленбисакриламида (образование межцепочечных сшивок). Смесь заливают между двумя пластинками, где и образуется гель. Процесс разделения фрагментов ДНК в полиакриламидном геле весьма чувствителен: фрагменты длиной до 500 п.н. разделяются, даже если они отличаются всего на 1 нуклеотид. Чем выше

концентрация этих веществ, тем мельче поры геля и тем медленнее движутся сквозь гель молекулы ДНК определенного размера. Это позволяет, используя гели различной концентрации, разделять молекулы ДНК в широком диапазоне их размеров, вплоть до 50 т.п.н. (табл. П.1). Процесс разделения прекращается, когда размер глобул превышает максимально возможный размер пор. В таких случаях используют электрофорез с пульсирующим электрическим полем или электрофорез с инверсией поля, которые позволяют разделять молекулы ДНК размером до 2000 т.п.н.

Таблица П.1

Зависимость длины разделяемых фрагментов ДНК
от концентрации агарозы или акриламида в геле.

Концентрация агарозы, %	Длина фрагментов ДНК, т.п.н.	Концентрация акриламида, %	Длина фрагментов ДНК, п.н.
0,3	5–60	3,5	1000–2000
0,6	1–20	5,0	80–500
0,9	0,5–7	8,0	60–400
1,2	0,4–6	12,0	40–200
1,5	0,2–3	15,0	25–150
2,0	0,1–2	20,0	6–100

В методе гель-электрофореза в пульсирующем поле (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) используются два взаимно перпендикулярных электрических поля, включающихся попеременно (Schwartz, Cantor, 1984). Молекулы ДНК движутся в таких полях в обоих направлениях, поэтому траектория их движения искривлена, что составляет определенные неудобства при анализе данных. Указанный недостаток отсутствует в методе с инверсией электрического поля (field-inversion gel electrophoresis, FIGE). В этом случае направление поля периодически меняется на противоположное, и молекулы ДНК движутся вперед-назад с паузой между двумя импульсами. Такой режим помогает преодолевать поры геля даже большим молекулам ДНК, которые при этом движутся по прямой линии.

Для электрофореза двунитевых молекул ДНК используют обычно 50 мМ трис-боратный буфер (ТВЕ) pH 7,5–7,8, а разделение одонитевых ДНК ведут в денатурирующих условиях (NaOH в агарозном геле, мочеви́на или формамид в полиакриламидном геле). В препараты ДНК добавляют интеркалирующее вещество этидиум бромид, который флюоресцирует под действием УФ-света, позволяя выявлять до 0,05 мкг двунитевых ДНК в одной зоне. Одонитевые ДНК выявляются существенно хуже. Оценку размеров ДНК в зонах производят, опираясь на данные о размерах рестриктов секвенированных молекул ДНК. Как правило, в качестве реперных фрагментов известной длины используют рестрикты ДНК фага λ , для которых предназначают одну из дорожек гелевой пластинки. Они позволяют определять размеры рестриктов изучаемой ДНК. Кроме того, зная концентрацию реперной ДНК, можно по степени интенсивности зон сделать оценку количества ДНК в изучаемых препаратах.

Гель-электрофорез используют не только для аналитических, но и для препаративных целей. Отмечено также, что связывание белка с фрагментом ДНК уменьшает его электрофоретическую подвижность, позволяя таким образом изучать особенности взаимодействия белок-ДНК.

Блотинг нуклеиновых кислот

Термин блотинг применяют к процедуре иммобилизации нуклеиновых кислот или белков на твердой подложке, обычно на нейлоновых или нитроцеллюлозных мембранах. Иммобилизованные ДНК и РНК используют в последующих гибридизационных экспериментах с целью детекции специфических последовательностей. Техника блотинга различна для разных источников нуклеиновых кислот. Блот по Саузерну (Southern blot) и нозерн блот (nothern blot) используют, соответственно, для извлечения ДНК или РНК из геля. Иммобилизацию ДНК из раствора ведут методом дот блота (dot blot). Процедура блотинга содержится и в методе гибридизации колоний при скрининге банка генов (см. гл. 9).

Саузерн (Southern, 1975) предложил оригинальную идею по переносу фрагментов ДНК из агарозного геля на гибридационную мембрану. Гель помещают на фильтровальную бумагу, находящуюся в контакте с буфером. Мембрану накладывают на гель, а сверху укладывают несколько слоев фильтровальной бумаги, легко абсорбирующей влагу (рис. П.1). Бумага служит своеобразным капиллярным насосом, способствуя вымыванию фрагментов ДНК током буфера из геля и переносу их на мембрану. Далее ДНК денатурируют щелочью, а мембрану выдерживают при 80 °С или облучают УФ-светом, что позволяет фиксировать ДНК на мембране. Затем мембрану помещают в раствор с меченым зондом, в котором и происходит гибридизация. После отмывки несвязавшейся радиоактивности результат выявляют с помощью радиоавтографии.

Стандартные условия блотинга по Саузерну не применимы к РНК, так как она не связывается с обычными нитроцеллюлозными и нейлоновыми мембранами. Для иммобилизации РНК вначале был предложен специальный вид бумаги с диазобензилоксиметилом (DMB-целлюлоза), а затем были найдены условия для нековалентного связывания РНК с нитроцеллюлозой (предварительная денатурация РНК диметилсульфоксидом, формальдегидом и др.) и разработаны для этого подходящие нейлоновые фильтры. По аналогии с блотингом по Саузерну (southern — южный) этот вид блотинга был назван нозерн (nothern — северный). В продолжение этой аналогии метод переноса белков из полиакриламидного геля на нитроцеллюлозные или нейлоновые мембраны (Burnette, 1981) был назван вестерн (western — восточный).

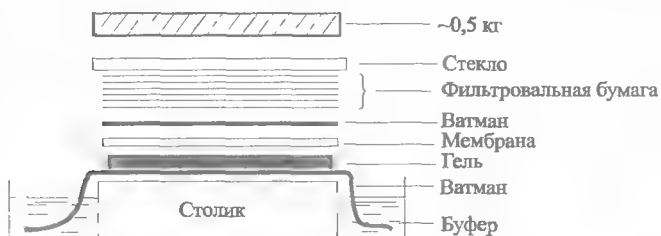


Рис. П.1. Схема блотинга по Саузерну

Отметим, что в описанных видах блотинга для организации потока ДНК, РНК и белков через гель к мембране вместо капиллярных сил используют также электрофорез и вакуум.

Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) позволяет за небольшое время увеличить количество специфической последовательности ДНК в миллионы раз (Mullis, Faloora, 1987). Для ее осуществления необходимо иметь два праймера, фланкирующих эту последовательность и ориентированных в направлении $5' \rightarrow 3'$ в ее сторону. Таким образом, праймеры гибридизуются с противоположными нитями ДНК, и при добавлении ДНК-полимеразы синтез ДНК идет на обеих нитях между праймерами.

Эффект умножения специфической последовательности ДНК достигается путем многократного повторения трех последовательных реакций: денатурации, ренатурации (связывание праймеров) и синтеза ДНК. Смена типа реакции задается изменением температуры реакционной смеси: 95 (0,5 мин) — 55 (1,5 мин) — 70 °С (1 мин). Указанные температуры являются средними. Их конкретные величины определяются строением праймеров и свойствами используемой ДНК-полимеразы.

В первом цикле после денатурации ДНК (95 °С) и связывания с ней праймеров (55 °С) ДНК-полимераза образует двунитевые структуры, в которых родительские нити ДНК соединены с вновь синтезированными комплементарными нитями различной длины, но с фиксированным $5'$ -концом (рис. П.2). Уже во втором цикле образуются обе нити специфической последовательности, имеющие заданные размеры. В третьем цикле эти нити дают, наконец, начало двунитевым детерминированным по размеру фрагментам ДНК. В каждом последующем цикле их число удваивается, достигая теоретически к 22-му, а на практике к 30-му циклу более миллиона копий. Исходные молекулы ДНК и структуры, образовавшиеся в первом цикле, присутствуют в реакционной смеси к концу ПЦР в ничтожных количествах.

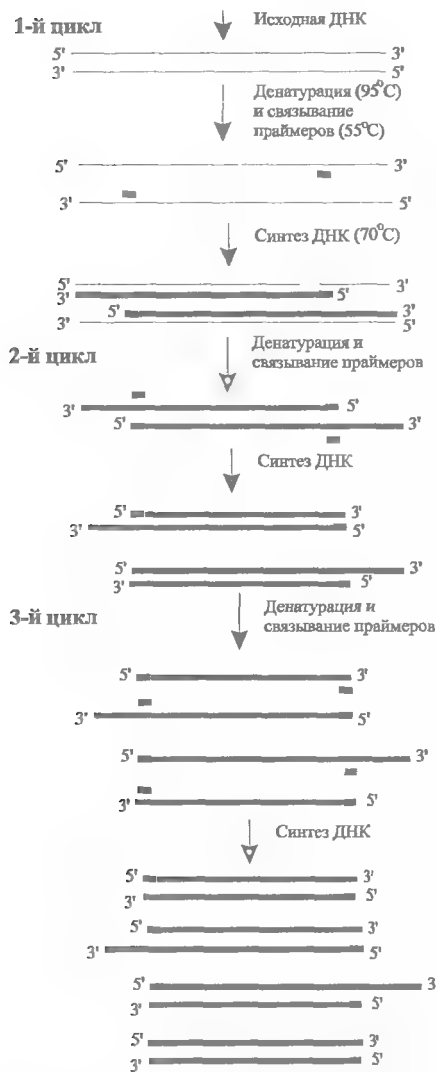


Рис. П.2. Начальные циклы полимеразной цепной реакции.

Тонкие линии — вновь синтезированная ДНК; жирная черта — праймер. В первом цикле показаны последовательные реакции; во втором и третьем циклах не показана судьба исходной ДНК. Первый дуплекс мультиплицированной ДНК появляется в третьем цикле

Стандартная ПЦР осуществляется автоматически в термощиклере в одной пробирке, содержащей около 1 мкг ДНК, 20 пикомолей каждого праймера, по 50 мкмоль каждого дезоксинуклеозидтрифосфата и две единицы термостабильной Taq ДНК-полимеразы. Ее преимуществом является термостабильность, недостатком — отсутствие 3'→5' экзонуклеазной активности, что приводит к появлению ошибок в синтезированной ДНК (см. гл. 6) около 0,25 % в конечном продукте. Конечно, эта величина не препятствует использованию таких ДНК в качестве гибридизационных зондов. Однако при установлении структуры индивидуальной ДНК следует просек-

венировать независимо выделенные клоны, надежнее всего — взятые из отдельных реакционных пробирок. Кроме того, этот фермент имеет тенденцию добавлять к 3'-концам дуплек-

сов дополнительные адениловые остатки, поэтому концы у дуплексов неровные. Это вызывает необходимость “выравнивать” концы перед клонированием мультиплицированного фрагмента. Отметим, наконец, что последовательности ДНК длиной более 3 т.п.н. умножаются этой полимеразой неэффективно.

Указанные недостатки отсутствуют у ДНК-полимераз ProofSprinter™ и AGSGold™, предлагаемых фирмой “Hybaid”. С их помощью можно синтезировать с повышенной точностью фрагменты размером до 15–20 т.п.н.

Область применения ПЦР велика и постоянно расширяется: диагностика генетических заболеваний, обнаружение генетического материала патогенных микроорганизмов в клинических образцах, синтез гибридизационных зондов, создание библиотек кДНК из малых количеств мРНК, мультипликация ДНК для целей секвенирования, направленный мутагенез и др. (“Genetic engeneering with PCR”, 1998).

Успех конкретной ПЦР существенно зависит от правильного выбора праймеров. Чтобы минимизировать возможность неправильного спаривания, праймер должен соответствовать некоторым требованиям. Его длина должна быть 17–30 нуклеотидов при содержании GC-пар около 50 %. Чем ниже содержание GC-пар в праймере, тем длиннее он должен быть. Следует избегать появления вторичных структур в праймере и более трех–четырёх одинаковых нуклеотидов подряд. Используемые в одной реакции праймеры не должны иметь комплементарных участков.

С помощью праймеров мультиплицируемую ДНК можно ограничивать с обоих концов последовательностями по выбору экспериментатора. С этой целью дополнительная последовательность нуклеотидов синтезируется на 5'-конце праймеров. В первом цикле праймеры связываются с ДНК только своей 3'-частью, но уже в последующих циклах дополнительная последовательность включается в мультиплицируемую ДНК и праймеры гибридизуются с ней по всей длине. Так обычно снабжают синтезированный дуплекс сайтами рестрикции, обеспечивая с их помощью возможность его клонирования.

Компьютерные методы

Компьютерные программы, используемые в генетической инженерии, предназначены для накопления и хранения первичных данных о структуре нуклеиновых кислот и белков, для анализа структурных и биологических свойств их последовательностей, а также для планирования стратегии синтеза олигонуклеотидов (генов) и белков ("Компьютерный анализ генетических текстов", 1990). Традиционные программы, предназначенные для работы на персональных компьютерах, собраны в пакеты. Из них можно упомянуть PCGENE, распространенный в российских лабораториях.

По данным сиквенса одной нити программы "строят" комплементарную нить, подсчитывают состав оснований, выделяют области, богатые GC- или AT-парами, представляют частоты встречаемости различных динуклеотидов, дают информацию о локализации специфических сайтов и т. д. Программы отыскивают прямые и инвертированные повторы в ДНК, причем можно задать степень негомологии и длину "стебля" шпильки. Нетривиальные повторы могут служить регуляторными сайтами, образуя совместно с регуляторными белками и вспомогательными факторами характерные структуры в самой ДНК или в РНК-транскрипте. Анализ на наличие и локализацию сайтов рестрикции, информация о числе и размере рестриктов, образуемых действием одной несколькими рестриктазами, позволяют планировать эксперименты по клонированию определенных участков геномной ДНК. При этом программы учитывают форму ДНК (линейная или кольцевая).

С внедрением сети Internet стало возможным проводить сложные анализы с использованием мощных международных вычислительных центров и банков данных.

Анализ структуры генома. К настоящему времени известны полные нуклеотидные последовательности многих сотен плазмидных и вирусных ДНК, а также ряда клеточных геномов (см. гл. 9). Отметим прежде всего, что само установление первичной последовательности ДНК невозможно без использования компьютерных методов. В случае секвенирования методом shot-gun в компьютере накапливаются данные по секвенированию отдельных участков генома, и при появлении перекрывающихся последова-

тельностью они группируются в контиги. Далее контиги наращиваются по длине и постепенно объединяются (Staden, 1986). Компьютерные программы ведут этот процесс с учетом данных по секвенированию обеих нитей, выявляют расхождения в данных и выводят рекомендации по стратегии и тактике секвенирования. В автоматических секвенаторах детектор сканирует авторадиограммы и вводит данные прямо в компьютер.

Программы по секвенированию геномов высших эукариот поставили перед компьютерными инженерами и программистами серьезные проблемы. Только хранение последовательности в 1 млн.п.н. требует приблизительно одного мегабайта компьютерной памяти. Таким образом, данные по человеческому геному займут три гигабайта памяти, и это не считая объема, необходимого для аннотаций и обслуживания этой информации. Развиваются программы для распознавания экспрессирующихся генов и идентификации однонуклеотидного полиморфизма как меры вариации человеческого генома.

Анализ найденных последовательностей нуклеотидов начинают с установления открытых рамок считывания (ORF), которые могут соответствовать определенным генам. Для этого специальные программы переводят нуклеотидную последовательность в аминокислотную по всем трем рамкам считывания каждой из нитей ДНК. С помощью программ выявляют необходимые атрибуты генов (промоторы и терминаторы транскрипции, сайты связывания рибосом, участки сплайсинга), что позволяет сделать уверенный вывод о наличии действующих генов. Проведенный анализ представляют в виде физической карты, на которой указаны ORF с направлением их ориентации и, когда возможно, промоторы и терминаторы транскрипции.

Анализ структуры генов и белков. Выявленные структуры генов и соответствующим им белков сравнивают с данными, хранящимися в мировых банках — GenBank (США) и EMBL (Германия). Задав, например, аминокислотную последовательность, можно с помощью пакета программ BLASTA сравнить ее не только с хранящимися в банках структурах белков, но и с потенциальными полипептидами, закодированными в нуклеотидных последовательностях. Найденные гомологичные последовательности

свидетельствуют об определенной степени родства генов (белков) и позволяют сделать предположения о функциях генов анализируемого генома. Серьезную помощь в анализе функций белков оказывает обнаружение в их структуре тех или иных “мотивов”, т. е. аминокислотных последовательностей, обеспечивающих определенные функции или служащие эпитопами.

Поиск и анализ гомологий, идеальных и частичных, играет важную роль в изучении эволюции на молекулярном уровне. Имеются алгоритмы сравнения определенной последовательности с одной или несколькими другими последовательностями и построения для них эволюционного древа. Существуют также программы, предсказывающие вторичную структуру однонитевых РНК или ДНК на основе знания последовательности оснований и с учетом термодинамических расчетов степени стабильности спирали. Это особенно важно для выяснения функций регуляторных асРНК.

Дизайн гибридизационных зондов. Гибридизационные зонды должны отвечать определенным требованиям:

- 1) длина от 20 до 50 нуклеотидов в зависимости от назначения;
- 2) содержание GC-пар около 50 %;
- 3) отсутствие внутримолекулярных шпилек.

Программы дизайна зондов учитывают два возможных источника информации для синтеза праймеров — ДНК (или РНК) и белок. В обоих случаях задается интервал нуклеотидной или аминокислотной последовательности, и программа предлагает лучший вариант для этого интервала. Из-за вырожденности кода зонд, синтезированный на основе данных по аминокислотной последовательности, не может быть полностью комплементарным отыскиваемой последовательности. В заданном интервале программа отыскивает участок, содержащий метионины и триптофаны (они имеют по одному кодону) и не включающий лейцины, серины и аргинины (они имеют по шесть кодонов). Как правило, программа предлагает вырожденные праймеры, отличающиеся друг от друга одним нуклеотидом. Вырожденные праймеры используются, когда неизвестна точная структура отыскиваемой последовательности (поиск нового гена какого-либо семейства генов, поиск межвидовых гомологичных генов, известна только структура белка).

Меры безопасности

Генетическая инженерия с момента зарождения привлекла внимание ученых и широких кругов общественности потенциальной опасностью некоторых исследований. Это опасение было высказано в 1974 году, вскоре после первых успешных экспериментов по получению рекомбинантных молекул ДНК методом *in vitro*. Группа известных молекулярных биологов во главе с П. Бергом призвала ученых к ограничению проведения ряда генно-инженерных экспериментов. Характер высказанных опасений был двоякого рода. Прежде всего указывалось на реальную возможность “утечки” клеток с рекомбинантными молекулами ДНК за пределы лаборатории или промышленных производств и, следовательно, угрозы внесения в организм человека или животных вредных чужеродных либо «собственных» продуктов (например, гормонов), но в неконтролируемых концентрациях. А это, естественно, может привести к негативным последствиям, которые трудно предсказать. Во-вторых, отсутствие достаточных знаний о структуре и функциях генов, находящихся в клонируемом фрагменте ДНК, может привести к тому, что при внесении их в реципиентные клетки они начнут синтезировать не только желаемое вещество, но и какие-либо опасные продукты (токсины, продукты онкогенов и т. п.).

В 1975 году данные проблемы обсуждались на Международной конференции, посвященной вопросам получения рекомбинантных молекул ДНК. В ней приняли участие ученые разных областей биологии (медицинской микробиологии, бактериальной генетики, вирусологии, эпидемиологии, биохимии, биофизики, ботаники, биологии развития и т.д.), а также юристы, представители прессы, государственных и частных промышленных компаний. Участники конференции пришли к выводу, что эксперименты с использованием методов генетической инженерии должны продолжаться, но при обязательном соблюдении определенных правил и рекомендаций. Эти правила были установлены в последующие годы в Англии, СССР, США, Франции и других странах. Неоднократно они пересматривались в сторону смягчения, так

как постепенно накапливающиеся данные свидетельствовали о неоправданной их строгости, особенно в отношении работ с традиционными лабораторными штаммами.

В настоящее время в России работы генно-инженерного плана регулируются федеральным законом, принятым в 1996 г. Они подразделяются на два типа — ведущиеся в “закрытых” или “открытых” системах. В закрытых системах работы ведутся таким образом, что имеется химический, биологический или физический барьер между генно-инженерными организмами и окружающей средой. В открытых же системах такой контакт осуществляется (например, культивирование генно-инженерных овощей).

Работы в закрытых системах в зависимости от степени риска подразделяются на четыре категории.

I. Работа не представляет опасности здоровью человека. Меры безопасности сравнимы с теми, которые установлены при работе с непатогенными микроорганизмами.

II. Работа представляет незначительную опасность здоровью человека. Меры безопасности сравнимы с теми, которые установлены при работе с микроорганизмами, потенциально патогенными лишь при определенных обстоятельствах.

III. Работа представляет умеренный риск здоровью человека. Меры безопасности сравнимы с теми, которые установлены при работе с микроорганизмами, потенциально способными к передаче инфекционных заболеваний.

IV. Работа представляет значительную опасность здоровью человека. Меры безопасности сравнимы с теми, которые установлены при работе с патогенами, вызывающими особо опасные болезни.

На практике меры, обеспечивающие безопасность опытов с рекомбинантными молекулами ДНК, включают приемы, обычные в микробиологических исследованиях, а также меры по физической и биологической защите.

Под мерами физической защиты понимается создание и использование специальных устройств, предотвращающих распространение биологических агентов в окружающем простран-

стве. Эти меры по своему характеру сближаются с мерами, действующими уже многие годы в медицинских, микробиологических и вирусологических лабораториях при работе с опасными микроорганизмами. Минимальный (Ф1) уровень физической защиты (работа без специального защитного оборудования) применяется в случае манипуляций с безопасными микроорганизмами. Низкий (Ф2) уровень физической защиты предусматривает более строгую изоляцию биоматериалов путем устройства боксов с отрицательным давлением воздуха и надежной герметизацией сосудов, содержащих рекомбинантные ДНК. Средний (Ф3) уровень физической защиты необходим при экспериментах с опасными объектами. Он достигается герметизацией всей лаборатории, но без ее изоляции от других помещений. При работе с микроорганизмами, особо опасными для человека, животных или растений, должен быть обеспечен высокий (Ф4) уровень физической защиты, для чего помимо выполнения требований уровня Ф3 лаборатории полностью изолируют.

Для биологической защиты в зависимости от степени потенциальной опасности создаваемых рекДНК предусмотрены три уровня. Уровень Б1 (наиболее слабая защита) обеспечивается при использовании клеток *E. coli* K-12 и векторов, полученных на основе неконъюгативных плазмид и бактериофагов, а также других клеток и векторов, обладающих сходной степенью безопасности. Уровень Б2 обеспечивается применением таких векторов и клеток, у которых вероятность перехода клонируемого фрагмента ДНК в окружающую среду составляет менее 10^{-8} . Уровень Б3 предусматривает использование систем вектор-клетка типа Б2, но испытанных на животных, включая и приматов, или апробированных в естественных экологических условиях.

Выбор уровня физической и биологической защиты зависит от меры опасности конкретного генно-инженерного эксперимента. Последняя определяется видовой принадлежностью клонируемой ДНК, ее длиной, степенью очистки, генетическими характеристиками и т. п.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Монографии и методические пособия

Анализ генома. Методы /Под ред. К. Дейвиса.—М.: Мир, 1990, 248 с.
Генная инженерия растений. Лабораторное руководство./Под ред. Дж. Драйпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. М.: Мир, 1991, 408 с.

Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. Санкт-Петербург: Специальная литература, 1997, 286 с.

Девис Р., Ботстайн Д., Рот Дж. Методы генетической инженерии: Генетика бактерий. М., 1984,—176 с.

Клонирование ДНК. Методы/Под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1988, 540 с.

Компьютерный анализ генетических текстов/Под ред. М.Д. Франк-Каменецкого. М.: Наука, 1990, 264 с.

Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984, 480 с.

Методы молекулярной генетики и геномной инженерии/Под ред. Р.И. Салганика. Новосибирск: Наука, 1990, 248 с.

Новое в клонировании ДНК. Методы/Под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1989, 368 с.

Плазмиды. Методы/Под ред. К. Харди.—М.: Мир, 1990, 268 с.

Свердлов Е.Д. (1995—98). Молек. генет. 1995, № 2:3—15; 1995, № 3:3—17; 1995 № 4:3—19; 1997 № 2:3—28; 1998 № 1:3—29.

Транскрипция и трансляция. Методы/Под ред. Б. Хеймса, С. Хиггинса. М.: Мир, 1987, 399 с.

Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д. Рекомбинантные ДНК: Краткий курс. М.: Мир, 1986, 480 с.

Фаг лямбда /Под ред. А.Д. Херши. М.:Мир, 1975, 424 с.

Хесин Р.Б. Непостоянство генома. М.: Наука, 1984, 472 с.

Щелкунов С.Н. Конструирование гибридных молекул ДНК. Новосибирск: Наука, 1987. 168 с.

Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. Ч.1. Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та, 1994. 304 с.

Янковский Н.К. Конструирование и анализ клонотек генов. М.: ВИНТИ, 1989. —252 с. (Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. Т. 16).

Adams A., Gottschling D.E., Kaiser C., Steams T. Methods in Yeast Genetics. A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Lab., 1998. 177 p.

Gene cloning and analysis: Current innovation/B.C. Schaefer (ed.). Horizon Scientific Press. Wymondham, UK, 1997. 214 p.

Genetic Engineering with PCR/R.M. Horton, R.C. Tait (eds.). Horizon Scientific Press. Wymondham, UK, 1998. 219 p.

Genome analysis. A laboratory manual. Vol. 1. Analyzing DNA/B. Bruce *et al.* (eds.). Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Lab., 1997. 675 p.

Genome analysis. A laboratory manual. Vol. 2. Detecting genes/B. Bruce *et al.* (eds.). Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Lab., 1998. 465 p.

Genome analysis. A laboratory manual. Vol. 3. Cloning systems/B. Bruce *et al.* (eds.). Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Lab., 1998. 650 p.

Genome analysis. A laboratory manual. Vol. 4. Mapping genomes/B. Bruce *et al.* (eds.). Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Lab., 1998. 650 p.

Kornberg A., Baker T. DNA Replication. W.H. Freeman and Company, New York, 1992. 932 p.

Lambda II/R.W. Hendrix, J.W. Roberts, F.W. Stahl, R.A. Weisberg (eds.). Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Lab., 1983. 792 p.

Maximizing gene expression/W. Reznikoff, L. Gold (eds.). Butterworths. Boston, MA. 1986, 376 p.

Miller J.H. A short course in bacterial genetics. Handbook. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Lab., 1992, a.—1.1—27.1 p.

Miller J.H. A short course in bacterial genetics. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Lab., 1992, b.—456 p.

Old R.W., Primrose S.B. Principles of Gene Manipulation. Blackwell Scientific Publ. London, 1994. 474 p.

PCR Primers: A laboratory Manual/C.W. Dieffenbach, G.S. Dveksler (eds.). Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Lab., 1995. 714 p.

Perbal B. A practical guide to molecular cloning (2nd edition). Wiley-Interscience publication, N.Y., 1988, 812 p.

Recombinant DNA Methodology/R. Wu, L. Grossman, K. Moldave (eds.). AP, N.Y., 1989. 760 p.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Lab., 1989. Vol. 1,2,3.

Zyskind J., Bernstein S. Recombinant DNA Laboratory Manual. AP, N.Y., 1989. 196 p.

Оригинальная литература

Артемьев Н.В., Васильев Г.В., Гуревич А.И. (1983). Биорган. химия 3:1544–1557.

Бойцов А.С., Голубков В.И. (1980). ДАН СССР 254:490–492.

Востров А.А., Малинин А.Ю., Рыбчин В.Н., Сварчевский А.Н. (1992). Генетика 28(7):186–188.

Григорьев П.С., Ценин А.Н., Рыбчин В.Н. (1978). ДАН СССР 243:1052–1054.

Дебабов В.Г. (1997). Молекул. биология 31:209–215.

Джинчарадзе А.Г., Иванов П.Л., Рысков А.П. (1987). ДАН СССР 295:230.

Долгих Д.А., Габриэлян А.Э., Наволоцкая Е.В. и др. (1993). Биофизика 38:67–74.

Йомантас Ю.В., Рабинович П.М., Бандрин С.В. и др. (1979). ДАН СССР 244:993–996.

Равин Н.В., Равин В.К. (1994). Молек. генет. №1:37–39.

Сварчевский А.Н., Рыбчин В.Н. (1984). Молек. генет. N10:16–21.

Свердлов Е.Д. (1995–98). Молек. генет. 1995, №2:3–15; 1995, №3:3–17; 1995, №4:3–19; 1997, №2:3–28; 1998, №1:3–29.

Финкельштейн А.В., Кирпичников М.П., Птицын О.Б. и др. (1988). Вестн. АН СССР 3:102–111.

Чистяков Д.А., Чумаков И.М. (1996). Молек. биол. 30:542–551.

Янковский Н.К., Фоништейн М.Ю., Лашина С.Ю. и др. (1987). Молек. биол. 21:831–836.

Aaij C., Borst P. (1972). Biochim. Biophys. Acta 269:192–200.

Aasen E., Medrano F. (1990). Bio/Technol. 8:1279–1281.

Abraham J.M., Freitag C.S., Clements J.R., Eisenstein B.I. (1985). Biochemistry 82:5724–5727.

Adam M.A., Ramesh N., Miller A.D., Osborne W.R.A. (1991). J. Virol. 65:4985–4990.

Agarwal K.L., Buchi H., Caruthers M.H. et al. (1970). Nature 227:27–34.

Andersen W.F., Killos L., Sanders-Haigh L. et al. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5399–5403.

Andersson S.G.E., Zomorodipour A., Andersson J.O. et al. (1998). Nature 396:133–140.

Andreadis A., Gallego M. E., Nadal-Ginard B. (1987). Ann Rev. Cell Biol. 3:207–242.

- Arber W., Dussoix D. (1962). *J. Mol. Biol.* 5:18–36.
- Avery O.D., MacLeod C.M., McCarty M. (1944). *J. Exp. Med.* 79:137–157.
- Azevedo V., Alvarez E. et al. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6047–6051.
- Bachmann B.J., Low K.B. (1980). *Microbiol. Reviews* 44:1–56.
- Bagdasarian M.M., Amann E., Lurz R. et al. (1983). *Gene* 26:273–282.
- Bagdasarian M., Lurz R., Ruckert B. et al. (1981). *Gene* 16:237–247.
- Baldari C., Murray J.A.H., Ghiara P. et al. (1987). *EMBO J.* 6:229–234.
- Baltimore D. (1970). *Nature* 226:1209–1211.
- Barbour A.G. (1990). *Annu. Rev. Microbiol.* 44:155–171.
- Barbour A.G., Garon C.F. (1987). *Science* 237: 409–411.
- Bates P.F., Swift R.A. (1983). *Gene* 26:137–146.
- Beeman R.W., Friesen K.S., Denell R.E. (1992). *Science* 256:89–92.
- Beggs J. D. (1978). *Nature* 275:104–109.
- Belfort M., Reaban M.E., Coetzee T., Dalggaard J.Z. (1995). *J. Bact.* 177:3897–3903.
- Bender W., Spierer P., Hogness D.S. (1983). *J. Mol. Biol.* 168:17–33.
- Berlyn M.B., Low K.B., Rudd K.E. (1996). In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and molecular Biology* (2nd edition). Neidhardt F.C., Curtiss R., III, Ingraham J.L. et al. (eds), pp. 1715–1902. Am. Soc. Microbiol., Washington, D. C.
- Bhandari P., Gowrishankar J. (1997). *J. Bact.* 179:4403–4406.
- Bingham P.M., Kidwell M.G., Rubin G.M. (1982). *Cell* 29:995–1004.
- Birikh K.R., Lebedenko E.N., Boni I.V., Berlin Y.A. (1995). *Gene* 164:341–345.
- Blancou J., Kieny M.P., Lathe R. et al. (1986). *Nature* 322:373–375.
- Blattner F.R., Williams B.G., Blechl A.E. et al. (1977). *Science* 196:161–169.
- Blattner F.R., Plunkett G., III, Bloch C.A. et al. (1997). *Science* 277:1453–1474.
- Boeke J.D., Xu H., Fink G.R. (1988). *Science* 239:280–282.
- Bolivar F., Rodriguez R.L., Betlach M.C., Boyer H.M. (1977a) *Gene* 2:75–93.
- Bolivar F., Rodriguez R.L., Greene P.J., Betlach M.C. et al. (1977b) *Gene* 2:95–113.
- Borst P., Greaves D.R. (1987). *Science* 235:658–667.
- Boyd A.C., Archer J.A.K., Sherratt D.J. (1989). *Mol. Gen. Genetics* 217:488–498.
- Brange J., Ribel U., Hansen J.F. et al. (1988). *Nature* 333:679–682.
- Brinster R.L., Chen H.Y., Warren R. et al. (1981). *Cell* 27:223–231.
- Broach J.R., Strathern J.N., Hicks J.B. (1979). *Gene* 8:121–133.
- Broglie K., Chet I., Holliday M. et al. (1991). *Science* 254:1194–1197.
- Broglie R., Coruzzi G., Fraley R.T. et al. (1984). *Science* 224:834–838.
- Broome S., Gilbert W. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:2746.

- Buchanan-Wollaston W., Passiatore J.E., Cannon F.* (1987). *Nature* 328:172–175.
- Buell G.N., Schultz M.F., Selzer G. et al.* (1985). *Nucleic Acids Res.* 13:1923–1938.
- Bult C.J., White O., Olsen G.J. et al.* (1996). *Science* 273:1058–1073.
- Burke D.T., Carle G.F., Olson M.V.* (1987). *Science* 236:806–812.
- Burnette W.N.* (1981). *Anal. Biochem.* 112:195–203.
- Cameron J.R., Loh E.Y., Davis R.W.* (1979). *Cell* 16:739–751.
- Campbell A.* (1962). *Advan. Genet.* 11:101–145.
- Campbell A.* (1988). In: *The bacteriophages*, Calendar R.(ed.), p. 1–14. NY: Plenum.
- Campbell A.* (1984). *Annu. Rev. Microbiol.* 48:193–222.
- Campbell A.* (1992). *J. Bacteriol.* 174:7495–7499.
- Campbell A., Botstein D.* (1983). In: *Lambda II*, p.p 365–380.
- Canosi U., Morelli G., Trautner T.A.* (1978). *Mol. Gen. Genetics* 166:259–267.
- Capecchi M.R.* (1980). *Cell* 22:479.
- Carozzi N.B., Warren G.W., Desai N. et al.* (1992). *Plant Mol. Biol.* 20:539–548.
- Carvano A.V., Lamerdin J., Ashworth L.K. et al.* (1989). *Genomics* 4:129–136.
- Chang A.C., Cohen S.N.* (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:1030–1034.
- Chang S., Cohen S.N.* (1979). *Mol. Gen. Genetics*. 168:111–115.
- Chen T.T., Powers D.A.* (1990). *Trends Biotechnol.* 8:209–215.
- Chu G., Sharp P.A.* (1981). *Nucleic acids Res.* 15:1311–1326.
- Church G.M., Kieffer-Higgins S.* (1988). *Science* 240:185–188.
- Cigan A.M., Donahue T.F.* (1987). *Gene* 59:1–18.
- Clackson T., Winter G.* (1989). *Nucleic Acids Res.* 17:10163–10170.
- Clarke L., Carbon J.* (1976). *Cell* 9:91–99.
- Clarke L., Carbon J.* (1980). *Nature* 287:504–509.
- Cline M.J., Stang H., Mercola K. et al.* (1980). *Nature* 284: 422–425.
- Cohen S.N., Chang A.C.Y., Boyer H.W., Helling R.B.* (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:3240–3244.
- Cole S.T., Brosch R., Parkhill J. et al.* (1998). *Nature* 393:537–544.
- Collins F.C., Weissman S.M.* (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6812–6816.
- Collins J., Hohn B.* (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4242–4246.
- Conner B.J., Reyes A.A., Morin C. et al.* (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:278–282.
- Corey D.R., Shiau A.K., Yang Q. et al.* (1993). *Gene* 128:129–134.
- Cox G.A., Cole N.M., Matsumura K. et al.* (1993). *Nature* 364:725–729.
- Crespi M., Messens E., Caplan A.B. et al.* (1992). *EMBO J.* 11:795–804.

- Crystal R.G., McElvaney N.G., Rosenfeld M. et al.* (1994). *Nature Genetics* 8:42–51.
- Curiel D.T., Agarwal S., Wagner E., Cotten M.* (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8850–8854.
- Daniels D.* (1990). *Nucleic Acids Res.* 18:2649–2651.
- Davis H.L., Whalen R.G.* (1995). In: *Molecular and Cell Biology of Human Gene Therapeutics*. Dicson G. (ed.), p. 368–387. London, Chapman and Hall.
- Deckert G., Warren P.V., Gaasterland T. et al.* (1998). *Nature* 392:353–358.
- De Greef W., Delon R., De Block M. et al.* (1989). *Biotechnology* 7:61–64.
- Della-Cioppa G., Garger S.J., Sverlow G.G. et al.* (1990). *Biotechnology* 8:634–638.
- Deloukas P., Schuler G.D., Gyapay G. et al.* (1998). *Science* 282:744–746.
- Dente L., Cesareni G., Cortese R.* (1983). *Nucleic Acids Res.* 11:1645–1655.
- Dertzbaugh M.T.* (1998). *Plasmid* 39:100–113.
- Dong J., Roth M.G., Hunter E.* (1992). *J. Virol.* 66:7374–7382.
- Dower W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W.* (1988). *Nucleic Acids Res.* 16:6127–6145.
- Dussoix D., Arber W.* (1962). *J. Mol. Biol.* 5:37–49.
- Ebert K.M., Selgrath J.P., Ditullio P. et al.* (1991). *Biotechnology* 9:835–838.
- Ehrlich S.D.* (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:1680–1682.
- Ehrlich S.D.* (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1433–1436.
- Fehilly C.B., Willdsen S.M., Tucker E.M.* (1984). *Nature* 307:634–636.
- Ferdows M.S., Barbour A.G.* (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5969–5973.
- Fitch J.H., Beachy R.N.* (1993). *Annu. Rev. Microbiol.* 47:739–763.
- Fleischmann R.D., Adams M.D., White O. et al.* (1995). *Science* 269:496–512.
- Franke A.E., Clewell D.B.* (1981). *J. Bacteriol.* 145:494–502.
- Fraser C.M., Gocayne J.D., White O. et al.* (1995). *Science* 270:397–403.
- Fraser C.M., Casjens S., Huang W.M. et al.* (1997). *Nature* 390:580–586.
- Fraser C.M., Norris S.J., Weinstock G.M. et al.* (1998). *Science* 281:375–388.
- Friedman D., Imperiale M.J., Adhya S.L.* (1987). *Ann. Rev. Genet.* 21:453–488.
- Frischauf A.-M., Lehrach H., Poustka A., Murray N.* (1983). *J. Mol. Biol.* 170:827–842.
- Gellert M.* (1981). *Annu. Rev. Biochem.* 50:879–910.
- GenBank* (1997). Accession AL009126.
- Gibson R.M., Errington J.* (1992). *Gene* 121:137–142.
- Gibson T.J., Rosenthal A., Waterston R.H.* (1987). *Gene* 53:283–286.
- Gill P., Ivanov P.L., Kimpton C. et al.* (1994). *Nature Genet.* 6:130–135.
- Gilson E., Saurin W., Perrin D., Bachellier S., Hofnung M.* (1991). *Nucleic Acids Res.* 19:1375–1383.

- Gluzman Y. (1981). *Cell* 23:175–182.
- Goeddel G.V., Heyneker H.I., Hozumi T. et al. (1979). *Nature* 281:544–548.
- Goeddel G.V., Kleid D.S., Bolivar F. et al. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:106–110.
- Goff S.P., Berg P. (1976). *Cell* 9:695–705.
- Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H. et al. (1996). *Science* 274:546–567.
- Golden J.W., Robinson S.J., Haselkorn R. (1985). *Nature* 314:419–423.
- Gordon J.W., Ruddle F.H. (1981). *Science* 214:1244–1246.
- Gormley E.P., Davies J. (1991). *J. Bacteriol.*, 173:6705–6708.
- Goursot R., Goze A., Niaudet B., Ehrlich S.D. (1982). *Nature* 298:488–490.
- Graham F.L., van der Eb A.J. (1973). *Virology* 52:456.
- Grimsley N., Hohn T., Davies J.W., Hohn B. (1987). *Nature* 325:177–179.
- Groisman E.A., Casadaban M.J. (1986). *J. Bacteriol.* 168:357–364.
- Grosjean H., Fiers W. (1982). *Gene* 18:199–209.
- Grunstein M., Hogness D.S. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:3961–3965.
- Guerette P.A., Ginzinger D.G., Weber B.H.F., Gosline J.M. (1996). *Science* 272:112–115.
- Gurdon J.B. (1962). *J. Embryol. Exptl. Morphol.* 10:622–640.
- Gurdon J.B., Lane C.D., Woodland H.R., Marbaix G. (1971). *Nature* 233:177–182.
- Gusella J.F., Wexler N.S., Conneally et al. (1983). *Nature* 306:234–238.
- Haima P., Bron S., Venema G. (1987). *Mol. Gen. Genetics* 209:335–342.
- Haima P., Bron S., Venema G. (1990). *Mol. Gen. Genetics* 223:185–191.
- Hall R. M., Collis C.M. (1995). *Molec. Microbiol.* 15:593–600.
- Harbers K., Jahner D., Jaenisch R. (1981). *Nature* 293:540–543.
- Harkki A., Uusitalo J., Bailey M. et al. (1989). *Bio/Technology* 7:596–603.
- Hanahan D., Meselson M. (1980). *Gene* 10:63–67.
- Hasty P., Ramirez-Solis R., Krumlauf R., Bradley A. (1991). *Nature* 350:243–246.
- Hedges R.W., Jacob A.F. (1974). *Mol. Gen. Genetics* 132:31–40.
- Heinemann J. A., Sprague G. F. (1989). *Nature* 340:205–209.
- Heinsley A., Arnheim N., Toney M.D. et al. (1989). *Nucleic Acids Res.* 17:6545–6551.
- Henikoff S. (1984). *Gene* 28:351–359.
- Herrera-Estrella L., Depicker A., Montagu M.V., Shell J. (1983). *Nature* 303:209–213.
- Hershfield V., Boyer H.W., Yanofsky C. et al. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:3455–3459.
- Higuchi R., Paddock G.V., Wall R., Salser W. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:3146–3150.

- Himmelreich R., Hilbert H., Plagens H. et al. (1996). *Nucleic Acids Res.* 24:4420–4449.
- Hinnebusch J., Barbour A.G. (1991). *J. Bacteriol.* 173:7233–7239.
- Hinnebusch J., Tilly K. (1991). *Molecular Microbiol.* 10:917–922.
- Hinnen A., Hicks J.B., Fink J.R. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929–1933.
- Hiraga S. (1992). *Annu. Rev. Biochem.* 61:283–306.
- Hirochika H., Sakaguchi K. (1982). *Plasmid* 7:59–65.
- Hitzeman R.A., Hagie F.E., Levine H.L. et al. (1981). *Nature* 293:717–722.
- Hitzeman R.A., Leung D.W., Perry L.J. et al. (1983). *Science* 219:620–625.
- Hochhut B., Jahreis K., Lengeler J.W., Schmid K. (1997). *J. Bacteriol.* 179:2097–2102.
- Hoekma A., Hirsch P.R., Hooykass P.J.J., Schilperoort R.A. (1983). *Nature* 303:179–183.
- Hohn B., Murray K. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:3259–3263.
- Holloway B., Low K.B. (1987). In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular Biology. Neidhardt F.C. (ed.), p. 1145–1153. Am. Soc. Microbiol., Washington, D. C.
- Hopwood D.A. (1993). *Curr. Opin. Biotechnol.* 4:531–537.
- Horsch R.B., Fraley J.E., Hoffmann N.L. et al. (1985). *Science* 227:1229–1231.
- Hwu P., Yannelli J., Kriegler M. et al. (1993). *J. Immunol.* 150:4101–4115.
- Hung M.-C., Wensink P.C. (1984). *Nucleic Acids Res.* 12:1863–1874.
- Hutchison C.A., III, Phillips M.H., Gillam S. et al. (1978). *J. Biol. Chem.* 253:6551–6560.
- Huynh T.V., Young R.A., Davis R.W. (1985). In: *DNA cloning: A practical approach*. Glover D.M. (ed.), vol. 1, p. 49. IRL Press, Oxford.
- Iida S. (1984). *Virology* 134:421–434.
- Ikemura T. (1985). *Mol. Biol. Evol.* 2:13–34.
- Itakura K., Hirose T., Crea R. et al. (1977). *Science* 198:1056–1063.
- Jackson D.A., Symonds R.H., Berg P. (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2904–2909.
- Jacob F. (1993). *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie* 316:547–549.
- Jacob F., Monod J. (1961). *J. Mol. Biol.* 3:318–356.
- Jaenisch R., Mintz B. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:1250–1254.
- Jaffe A., Ogura T., Hiraga S. (1985). *J. Bacteriol.* 163:841–849.
- Janniere L., Bruand C., Ehrlich S.D. (1990). *Gene* 81:53–61.
- Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. (1985). *Nature* 316:76–79.
- Jones D., Errington J. (1987). *J. Gen. Microbiol.* 133:483–492.
- Jordan E., Saedler H., Starlinger P. (1968). *Mol. Gen. Genetics* 102:353–365.

- Kan Y.W., Dozy A.M. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:5631–5635.
- Kaneko T., Sato S., Kotani H. et al. (1996). *DNA res.* 3(3):109–136.
- Karn J., Matthes H.W., Gait M.J., Brenner S. (1984). *Gene* 32:217–224.
- Kato S., Sekine S., Oh S.-W. et al. (1994). *Gene* 150:243–250.
- Kawarabayasi Y., Sawada M., Horikawa H. et al. (1998). *DNA Res.* 5:55–76, 5:147–155.
- Kelly T.J., Smith H.O. (1970). *J. Mol. Biol.* 51: 393–409.
- Kholodii G., Mindlin S.Z., Bass I.A. et al. (1995). *Molec. Microbiol.* 17:1189–1200.
- Kholodii G., Yurieva O., Gorlenko Zh.M. et al. (1997). *Microbiology* 143:2549–2556.
- Khorana H.G. (1979). *Science* 203:614–625.
- Khorana H.G., Agarwal K.L., Besmer P. et al. (1976). *J. Biol. Chem.* 251:565–570.
- Kilby N.J., Smith M.R., Murray J.A.H. (1993). *Trends in Genet.* 9:413–420.
- Kim Y.G., Kim P.S., Herbert A., Rich A. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12875–12879.
- Kleckner N. (1989). In: *Mobile DNA*. Berg P. and Howe M. (eds.), p. 227–268. *Am. Soc. Microbiol.*, Washington D.C.
- Klein T.M., Wolf E.D., Wu R., Sanford J.C. (1987). *Nature* 327:70–73.
- Klenk H.P., Clayton R.A., Tomb J. et al. (1997). *Nature* 390:364–370.
- Klinman D.M., Cohen D.I. (1987). *Anal. Biochem.* 161:65–88.
- Kniskern P.J., Hagopian A., Montgomery D.L. et al. (1986). *Gene* 46:135–141.
- Knott V., Blake D.J., Brownlee G.G. (1989). *Nucleic Acids Res.* 17:5901–5912.
- Kohara Y. (1990). In: *The bacterial chromosome*. Drlica K. and Riley M. (eds.), p. 29–42. *Am. Soc. Microbiol.*, Washington, D.C.
- Kohara Y., Akiyama K., Isono K. (1987). *Cell* 50:495–508.
- Kohler G., Milstein C. (1975). *Nature* 256:495–497.
- Kohler S.W., Provost G.S., Kretz P.L. et al. (1990). *Genet. Anal. Tech. Appl. (USA)*. 7:212–218.
- Kolst A.-B. (1997). *Molec. Microbiol.* 24:241–248.
- Konec C., Olsson O., Langridge W.H.R. et al. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:131–135.
- Kotula L., Curtis J. (1991). *Biotechnology* 9:1386–1389.
- Krawiec S., Riley M. (1990). *Microbiol. Reviews*, 54:502–539.
- Kouprina N., Annab L., Graves J. et al. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:4469–4474.
- Kozak M. (1984). *Nucleic Acids Res.* 12:857–872.
- Kozak M. (1986). *Cell* 44:283–292.

- Krens F.A., Molendijk L., Wullems G.J., Schilperoort R.A. (1982). *Nature* 296:72–74.
- Kuchler K. (1993). *Trends Cell Biol.* 3:421–426.
- Kulkosky J., Jones K.S., Katz R.A. et al. (1992). *Mol. Cell Biol.* 12:2331–2338.
- Kunkel B., Losick R., Stragier P. (1990). *Genes Dev.* 4:525–535.
- Kunkel T.A. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488–492.
- Kupiec J.J., Giron M.L., Vilette D. et al. (1987). *Anal. Biochem.* 164:53–59.
- Kurtz D.T., Nicodemus C.F. (1981). *Gene* 13:145–152.
- Lambowitz A.M., Belfort M. (1993). *Annu. Rev. Biochem.* 62:587–622.
- Land H., Grey M., Hanser H. et al. (1981). *Nucleic Acids Res.* 9:2251–2266.
- Larionov V., Kouprina N., Graves J. et al. (1996a). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:491–496.
- Larionov V., Kouprina N., Graves J., Resnick M.A. (1996b). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13925–13930.
- Larionov V., Kouprina N., Solomon G. et al. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:7384–7387.
- Law P.K., Goodwin T.G., Fang Q. et al. (1992). *Cell Transformation* 1:235–244.
- Lazarus R.A., Seymour J.L., Stafford R.K. et al. (1990). In: *Biocatalyses*. Abramowitz D. (ed.), p. 136–155. Van Nostrand, New York.
- Lessl M., Lanka E. (1994). *Cell* 77:321–324.
- Lim D., Maas W.K. (1989). *Cell* 56:891–904.
- Lin Y.-S., Kieser H.M., Hopwood D.A., Chen C.W. (1993). *Mol. Microbiol.* 10:923–933.
- Lindqvist B.H., Deho G., Calendar R. (1993). *Microbiol. Reviews* 57:683–702.
- Liu Z., Moav B., Faras A. et al. (1990). *Biotechnology* 8:1268.
- Lobban P.E., Kaiser A.D. (1973). *J. Mol. Biol.* 78:453–471.
- Low K.B. (1972). *Bacteriol. Reviews* 36:587–607.
- Mandel M., Higa A. (1970). *J. Mol. Biol.* 53:159–162.
- Maniatis T., Hardison R.C., Lacy E. et al. (1978). *Cell* 15:687–707.
- Mann R.S., Mulligan R.C., Baltimor D. (1983). *Cell* 32:871–879.
- Martial J.A., Hallewell R.A., Baxter J.D., Goodman H.M. (1979). *Science* 205:602–607.
- Maruyama I.N., Maruyama H.I., Brenner S. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8273–8277.
- Matsuzaki H., Nakajima R., Nishiyama J. et al. (1990). *J. Bacteriol.* 172:610–618.
- Maxam A.M., Gilbert W. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:560–564.
- McCafferty J., Jackson R.H., Chiswell D.J. (1991). *Prot. Engin* 4:955–961.
- McClure W.R., Hawley D.K., Youderian P., Suskind M.M. (1983). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47:477–481.

- McKusick V.A. (1994). Mendelian inheritance in man: a catalog of human genes and genetic disorders.—11 ed.—Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Meissner P.S., Sisk W.P., Berman M.L. (1987). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4171–4175.
- Messing J. (1983). Methods Enzymol. 101:20–78.
- Metcheva I.S., Stedman T.T., Buck G.A. (1996). J. Euk. Microbiol. 43:171–176.
- Mikawa Y.G., Maruyama I.N., Brenner S. (1996). J. Mol. Biol. 262:21–30.
- Milkman R., Bridges M.M. (1993). Genetics 133:455–468.
- Miller N., Vile R. (1995). The FASEB J. 9:190–199.
- Miyake T., Oka T., Nishizawa T. et al. (1985). J. Biochem. 97:1429–1436.
- Miyashita S., Hirochika H., Ikeda J., Hashiba T. (1990). Mol. Gen. Genetics 220:165–171.
- Moir A., Brammar W. J. (1976). Mol. Gen. Genetics 149:87–99.
- Monroe D., Jacobson A. (1990). Gene 91:151–158.
- Morrow J.F., Cohen S.N., Chang A.C.Y. et al. (1974). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:1743–1747.
- Morse M., Lederberg E., Lederberg J. (1956). Genetics 41:121.
- Moss B., Smith G.L., Gerin J.L., Purcell R.H. (1984). Nature 311:67–69.
- Mozo T., Hooykaas P.J.J. (1992). Mol. Gen. Genet. 236:1–7.
- Mulligan R.C., Berg P. (1980). Science 209:1422–1427.
- Mulligan R.C., Berg P. (1981a). Mol. Cell Biol. 1:449–459.
- Mulligan R.C., Berg P. (1981b). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072–2076.
- Mulligan R.C., Howard B.H., Berg P. (1979). Nature 277:108–114.
- Mullis K.B., Faloora F. (1987). Methods Enzymol. 155:335–350.
- Murdock D., Ensley B.D., Serdar C., Thalen M. (1993). Biotechnology 11:381–386.
- Murphy J.R., Bishai W., Borowski M. et al. (1986). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258–8262.
- Murray A.W., Szostak J.W. (1983). Nature 305:189–193.
- Murray N.E., Murray K. (1974). Nature 251:476–481.
- Nag D.K., Huang H.V., Berg D.E. (1988). Gene 64:135–145.
- Naito T., Kusano K., Kobayashi I. (1995). Science 267:897–899.
- Neumann E., Schaeffer-Ridder W., Wang Y., Hofschneider P.H. (1982). EMBO J. 1:841–845.
- Nordstrom K., Austin S.J. (1989). Annu. Rev. Genet. 23:37–69.
- Oeller P.W., Miw-Wong L., Taylor L.P. et al. (1991). Science 254:437–439.
- Oka T., Sakamoto S., Miyoshi K. et al. (1985). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7212–7216.
- Okayama H., Berg P. (1982). Mol. Cell. Biol. 2:161–170.

- Olins P.O., Rangwala S.H.* (1989). *J. Biol. Chem.* 264:16973–16976.
- Palmiter R.D., Brinster R.L., Hamer R.E. et al.* (1982). *Nature* 300:611–615.
- Panayotatos N., Fontaine A., Truong K.* (1983). *J. Cell Biochem. Supplement* 7B:109.
- Parmley S.E., Smith P.G.* (1988). *Gene* 73:305–318.
- Pauling L., Corey R.* (1951). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37:235.
- Perez-Martin J., Rojo F., de Lorenzo V.* (1994). *Microbiol. Rev.* 58:268–290.
- Perry L.J., Wetzel R.* (1984). *Science* 226:555–557.
- Petrusyte M., Bitinaite J., Menkevicius S. et al.* (1988). *Gene* 74:89–91.
- Phadnis S.H., Huang H.V., Berg D.E.* (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5908–5912.
- Powell-Abel P., Nelson R.S., Hoffmann N. et al.* (1986). *Science* 232:738–743.
- Prichard A.E., Cummings D.J.* (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7341–7345.
- Radstrom P., Skold O., Swedberg G. et al.* (1994). *J. Bacteriol.* 176:3257–3268.
- Ravin V.K., Schulga M.G.* (1970). *Virology* 40:800–807.
- Rayssiguier C., Thaler D.S., Radman M.* (1989). *Nature* 342:396–401.
- Reidhaar-Olson J.F., Sauer R.T.* (1988). *Science* 241:53–57.
- Resibois A., Toussaint A., Van Gilsegem F., Faellen M.* (1981). *Gene* 14:103–113.
- Reznikoff W.S., Siesele D.A., Cowiny W., Gross C.A.* (1985). *Ann. Review Genet.* 19:355–387.
- Rogers D.T., Hiller E.* (1990). *Proc. 6-th Inter. Symp. Genet. Indust. Microorg., Heslot H. et al. (eds.), p. 533–544. Société Française de Microbiologie, Strasbourg.*
- Rose M.D., Casadaban M.J., Botstein D.* (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2460–2464.
- Rose M.D., Novick P., Thomas J.H. et al.,* (1987). *Gene* 60:237–243.
- Rosenberg A.N., Lade B.N., Chui D. et al.* (1987). *Gene* 56:125–135.
- Rosenberg S.M., Stahl M.M., Kobayashi J., Stahl F.F.* (1985). *Gene* 38:165–175.
- Rubin G.M., Kidwell M.G., Bingham P.M.* (1982). *Cell* 29:987–994.
- Salter D.W., Critten L.B.* (1988). *Occasional Publications of the British Society of Animal Production* 12:32–57.
- Sanger F., Coulson A.R.* (1975). *J. Mol. Biol.* 94:444–448.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.* (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463–67.
- Sanger F., Coulson A.R., Hong G.-F., Hill D.F., Petersen G.B.* (1982). *J. Mol. Biol.* 162:729–773.
- Schaffner W.* (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2163–2167.
- Schoner B.E., Belagaje R.M., Schoner R.G.* (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8506–8510.

- Schweizer H.P.* (1991). *Gene* 97:109–112.
- Schwartz D.C., Cantor C.R.* (1984). *Cell* 37:67–75.
- Science* (1998). 282:2011–2046.
- Scott J.R.* (1991). In: *Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci, and Enterococci*. Dunny G.M. *et al.* (eds.), p. 28–33. Am. Soc. Microbiol., Washington, D. C.
- Seed B.* (1983). *Nucleic Acids Res.* 11:2427–2445.
- Sengupta-Gopalan C., Reichert N.A., Barker R.F. et al.* (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3320–3324.
- Seno M., Hinuma S., Onda S., Igarashi K.* (1986). *FEBS Lett.* 199:187–192.
- Sevigny P., Gossard F.* (1990). *Gene* 93:143–146.
- Shah D.M., Horsch R.B., Klee H.J. et al.* (1986). *Science* 233:478–481.
- Shapiro J.A.* (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1933–1937.
- Shapiro J., MacHattie L., Eron L. et al.* (1969). *Nature* 224:768–774.
- Shaw G., Kamen R.* (1986). *Gene* 23:315–330.
- Sheehy R.E., Kramer M., Hiatt W.R.* (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8805–8809.
- Shemyakin M.F., Chestukhin A.V., Dolganov G.M. et al.* (1980). *Nucl. Acids Res.* 8:6163–6174.
- Shen S.-H.* (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4627–4631.
- Sheng Yu.L., V., Birren B.* (1995). *Nucleic Acids Res.* 23:1990–1996.
- Shizuya H., Birren B., Kim U.-J. et al.* (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8794–8797.
- Sia E.A., Roberts R.C., Easter C. et al.* (1995). *J. Bacteriol.* 177:2789–97.
- Sia E.A., Kuehner D.M., Figurski D.H.* (1995). *J. Bacteriol.* 178:1457–1464.
- Simon M.I., Silverman M.* (1983). In: *Gene functions in prokaryotes*. Beckman J., Davis J., Gallant J.A. (eds.), p. 211–227. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Lab.
- Singer M., Baker T. A. et al.* (1989). *Microbiol. Reviews* 53:1–24.
- Smith D.R., Doucette-Stamm L.A., Deloughery C. et al.* (1997). *J. Bacteriol.* 179:7335–7355.
- Smith G.L., Mackett M., Moss B.* (1983a). *Nature* 302:490–495.
- Smith G.L., Murphy B.R., Moss B.* (1983b). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:7155–7159.
- Smith G.R.* (1985). *Science* 228:65–66.
- Smith H.O., Wilcox K. W.* (1970). *J. Mol. Biol.* 51:379–391.
- Sorge J.A.* (1988). In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*. Rodriguez R.L. and Denhardt D.T. (eds.), p. 43. Butterworth Publishers, Stoneham, Massachusetts.

- Southern E.M.* (1975). *J. Mol. Biol.* 98:503–517.
- Spradling A.C., Rubin G.M.* (1982). *Science* 218:341–347.
- Staden R.* (1986). *Nucleic Acids Res.* 14:217–232.
- Stebbing N., May L.* (1982). *J. Virological Methods* 5:309–315.
- Stephens R.S., Kalman S., Lammel C.J. et al.* (1998). *Science*, in press.
- Sternberg N.* (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:103–107.
- Stevis P.E., Ho N.W.* (1987). *Gene* 55:67–74.
- Stokes H.W., Hall R.M.* (1989). *Mol. Microbiol.* 3:1669–1683.
- Stormo G.D.* (1986). In: *Maximizing gene expression*. Reznikoff W. and Gold L. (eds.), p. 195–224. Butterworths, Boston, MA.
- Stover C.K., de la Cruz V.F., Fuerst T.R. et al.* (1991). *Nature* 351:456–460.
- Struhl K., Stinchcomb D.T., Scherer S., Davis R.W.* (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1035–1039.
- Studier F.W., Moffatt B.A.* (1986). *J. Mol. Biol.* 189:113–130.
- Suihko M.-L., Blomqvist K., Pentilla M. et al.* (1990). *J. Biotechnol.* 14:285–300.
- Suwanto A., Kaplan S.* (1989). *J. Bacteriol.* 171:5850–5859.
- Szostak J.W., Blackburn E.H.* (1982). *Cell* 29:245–255.
- Szybalska E.H., Szybalski W.* (1962). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:2026.
- Talmadge K., Gilbert W.* (1980). *Gene* 21:235–241.
- Tang D.C., Devit M., Jonston S.A.* (1992). *Nature* 356:152–154.
- Temin H.M., Mizutani S.* (1970). *Nature* 226:1211–1213.
- Tomas M., Cameron J.R., Davis R. W.* (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:4579–4583.
- Thomas C.M., Stalker D.M., Helinsky D.R.* (1981). *Mol. Gen. Genetics* 81:1–7.
- Tomb J.-F., White O., Kerlavage A.R. et al.* (1997). *Nature* 388:539–547.
- Tominaga A., Ikemizu S., Enomoto M.* (1991). *J. Bacteriol.* 173:4079–4087.
- Twigg A.J., Sherratt D.* (1980). *Nature* 283:216–218.
- Ullmann A., Perrin D.* (1970). In: *The lactose operon*. Beckwith J.R. and Zipser D. (eds.), p. 143. Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor, NY.
- Ulmer J.B., Donnelly J.J., Parker S.F. et al.* (1993). *Science* 259:1745–1748.
- Umeda M., Ohtsubo E.* (1989). *J. Mol. Biol.* 208:601–614.
- Vassart G., Georges M., Moniaieur R. et al.* (1987). *Science* 235:683–684.
- Vaux D.L., Haecker G., Strasser A.* (1994). *Cell* 76:777–779.
- Vieira J., Messing J.* (1987). *Methods Enzymol.* 153:3–11.
- Vieira J., Messing J.* (1991). *Gene* 100:189–194.
- Vieweg J., Boczkowski D., Robertson K.M. et al.* (1994). *Cancer Res.* 55:2366–2372.

- Villa-Komaroff L., Efstratiadas A., Broome S. et al.* (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3727–3721.
- von Heijne G.* (1985). J. Mol. Biol. 184:99–105.
- Wahl G.M., Lewis K.A., Ruiz J.C. et al.* (1987). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2160.
- Ward J.M., Janssen G.R., Kieser T. et al.* (1986). Mol. Gen. Genetics 203:468.
- Watson J.D. and Crick F.H.C.* (1953). Nature 171:737–738.
- Weiss A.A., Johnson F.D., Burns D.L.* (1993). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2970–2974.
- Whittam T.S., Ochman H., Selander R.K.* (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1751–1755.
- Wigler M., Sweet R., Lee L.S. et al.* (1979). Science 16:777–785.
- Wilkinson A.J., Fersht A.R., Blow D.M. et al.* (1984). Nature 307:187–188.
- Wilmot I., McWhier J., Campbell K. et al.* (1997). Nature 385:810–813.
- Winans S.C.* (1992). Microbiol. Rev. 56:12–31.
- Wohlleben W., Muth G.* (1993). In: Plasmid. A practical approach. Hardy K.G. (ed.), p. 147–175. IRL Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Wolff J.A., Malone R.W., Williams P. et al.* (1990). Science 247:1465–1468.
- Wright G., Carver A., Cottom D. et al.* (1991). Biotechnology 9:830–834.
- Wu X.-C., Lee W., Tran L., Wong S.-L.* (1991). J. Bacteriol. 173:4952–4958.
- Yanish-Perron C., Vieira J., Messing J.* (1985). Gene 33:103–119.
- Yarmolinsky M.* (1995). Science 267:836–837.
- Yarmolinsky M.B., Lobocka M.B.* (1993). In: Genetic maps, 6th edition. O'Brien S.J. (ed.). Book 1. Viruses, p. 1.50. Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor, NY.
- Yarmolinsky M.B., Sternberg N.* (1988). In: The bacteriophages. Calendar R. (ed.). v. 1, p. 291–438. Plenum Press, New York, N.Y.
- Young R.A., Davis R.W.* (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1194–1198.
- Zabarovsky E.R., Allikmet R.L.* (1986). Gene 42:119–123.
- Zambryski P., Joos H., Genetello C. et al.* (1983). EMBO J. 2:2143–2150.
- Zinder N.D., Lederberg J.* (1952). J. Bacteriol. 64:679–699.
- Zwarthoff E.C., Gennissen A., Bosveld I.L. et al.* (1987). Biochim. Biophys. Res. Commun. 147:47–55.

СОКРАЩЕНИЯ

Антибиотики

Ap — ампициллин
Bm — блеомицин
Cb — карбенициллин
Cm — хлорамфеникол
Gm — гентамицин
Fu — фузидовая кислота
Em — эритромицин
Ent — энтеротоксин
Km — канамицин
Nm — неомицин
Sm — стрептомицин
Sp — спектиномицин
Su — сульфамид
Tc — тетрациклин
Tp — триметоприм

Другие

п.н. — пар нуклеотидов
т.п.н. — тысяча пар нуклеотидов
млн. п.н. — миллион пар нуклеотидов
кДа — килодальтон
ПЦР — полимеразная цепная реакция
ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота
IPTG — изопропилтиогалактозид
MCS — сайт поликлонирования (полилинкер)
RBS — сайт связывания рибосом
SD — последовательность Шайна-Далгарно
SDS — додецилсульфат натрия, детергент
Py — пиримидин
Pu — пурин
N — любой нуклеотид
(N/N) — альтернативные нуклеотиды

ОБОЗНАЧЕНИЯ ОСНОВНЫХ 20 АМИНОКИСЛОТ

Аминокислота	Обозначения		
	Русское	Английское	Однобуквенное
Аланин	Ала	Ala	A
Аргинин	Арг	Arg	R
Аспарагин	Асн	Asn	N
Аспарагиновая кислота	Асп	Asp	D
Валин	Вал	Val	V
Гистидин	Гис	His	H
Глицин	Гли	Gly	G
Глутамин	Глн	Gln	Q
Глутаминовая кислота	Глу	Glu	E
Изолейцин	Иле	Ile	I
Лейцин	Лей	Leu	L
Лизин	Лиз	Lys	K
Метионин	Мет	Met	M
Пролин	Про	Pro	P
Серин	Сер	Ser	S
Тирозин	Тир	Tyr	Y
Треонин	Тре	Thr	T
Триптофан	Три	Trp	W
Фенилаланин	Фен	Phe	F
Цистеин	Цис	Cys	C

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Автораддиография — способ обнаружения вещества, меченного радиоактивным изотопом, путем его наложения на чувствительную пленку.

Аллель — вариант определенного гена у диплоидных организмов; аллели, как правило, отличаются последовательностями нуклеотидов.

Ампликон — внехромосомная единица амплификации.

Амплификация — увеличение числа копий генов (количества ДНК).

Амфидиплоиды — эукариотические клетки, содержащие два двойных набора хромосом в результате объединения двух геномов.

Антибиотик — вещество, подавляющее рост клеток или убивающее их. Обычно антибиотики блокируют одну из стадий синтеза белков или нуклеиновых кислот.

Антиген — вещество (обычно белки, реже полисахариды), вызывающее у животных иммунный ответ (образование антител).

Антигенная детерминанта (эпитоп) — участок белковой или полисахаридной молекулы, обладающий способностью вызывать образование антител данной специфичности.

Антитело — белок (иммуноглобулин), образуемый иммунной системой организма животных в ответ на введение антигена и способный вступать с ним в специфическое взаимодействие.

Бактериофаг — вирус бактерий; состоит из ДНК или РНК, упакованной в белковую оболочку.

Банк (библиотека) генов — полный набор генов данного организма, полученный в составе рекомбинантных ДНК

Белковая инженерия — создание искусственных белков с заданными свойствами путем направленных изменений (мутаций) в генах или путем обмена локусами между гетерологичными генами.

Блотинг — перенос молекул ДНК, РНК или белка из геля, в котором шел электрофорез, на нитроцеллюлозный фильтр (мембрану).

Вакцина — препарат ослабленного или убитого инфекционного агента (вируса, бактерии и т.п.) или его отдельных компонентов, несущих антигенные детерминанты, способный вызывать образование иммунитета к данной инфекции у животных (человека).

Везикулы — мембранные пузырьки.

Вектор — молекула ДНК, способная к включению чужеродной ДНК и к автономной репликации, служащая инструментом для введения генетической информации в клетку.

Вирусы — инфекционные агенты неклеточной природы, способные в процессе реализации генетической информации, закодированной в их геноме, перестроить метаболизм клетки, направив его в сторону синтеза вирусных частиц.

Водородная связь — образуется между электроотрицательным атомом молекулы (кислород, азот) и электроположительным ядром водорода (протоном), который, в свою очередь, ковалентно связан с другим электроотрицательным атомом той же или соседней молекулы.

β-Галактозидаза — фермент, гидролизующий β-галактозиды, в частности лактозу, с образованием свободной галактозы.

Гаплоид — клетка, содержащая одинарный набор генов или хромосом.

Ген — участок молекулы ДНК или РНК, кодирующий структуру какого-либо полипептида или РНК.

Ген-регулятор — ген, кодирующий регуляторный белок, активирующий или подавляющий транскрипцию других генов.

Ген-репортер — ген, чей продукт определяется с помощью простых и чувствительных методов и чья активность в тестируемых клетках в норме отсутствует. Используется в генно-инженерных конструкциях для маркирования целевого продукта.

Генетический код — соответствие между триплетами в ДНК (или РНК) и аминокислотами белков.

Геном — суммарная генетическая информация, содержащаяся в хромосомах организма.

Генетическая карта — схема расположения структурных генов и регуляторных элементов в хромосоме.

Генотип — наследуемые свойства организма.

Гетерозиготность — наличие разных аллелей в диплоидной клетке.

Гибридизация ДНК — образование в опыте двуцепочечной ДНК или дуплексов ДНК:РНК в результате взаимодействия комплементарных нуклеотидов.

Гибридизация соматических клеток — слияние неполовых клеток, способ получения соматических гибридов (см.).

Гибридный белок (полипептид) — см. Слитый белок (полипептид).

Гибридомы — гибридные лимфоидные клетки, полученные путем слияния опухолевой миеломной клетки с нормальными лимфоидными клетками иммунизированного животного или человека.

Гликозилирование — присоединение к белку углеводного остатка.

Гомозиготность — наличие одинаковых аллелей в диплоидной клетке.

Денатурация — нарушение пространственной структуры молекулы в результате разрыва внутри- или межмолекулярных нековалентных связей.

ДНК-полимераза — фермент, ведущий матричный синтез ДНК.

Доминантность — преимущественное участие только одного аллеля в формировании признака у гетерозиготной клетки.

Иммунитет — невосприимчивость организма к инфекционным агентам типа вирусов и микробов.

Иммунотоксин — комплекс между антителом и каталитической субъединицей какого-либо белкового яда (дифтерийного токсина, рицина, абрина и др.).

Индуктор — фактор (вещество, свет, теплота), вызывающий транскрипцию генов, находящихся в неактивном состоянии.

Индукция профага — инициирование вегетативного развития фага в лизогенных клетках.

Интеграза — фермент, осуществляющий внедрение какого-либо генетического элемента в геном через специфический сайт.

Интегроны — генетические элементы, которые содержат в себе ген интегразы, специфический сайт и рядом с ним промотор, что придает им способность интегрировать в себя мобильные генные кассеты и экспрессировать присутствующие в них беспромоторные гены.

Интерфероны — белки, синтезируемые клетками позвоночных в ответ на вирусную инфекцию и подавляющие их развитие.

Интрон — некодирующий участок гена, который транскрибируется, а затем удаляется из предшественника мРНК при сплайсинге (см. сплайсинг).

Интронированный ген — ген, содержащий интроны.

Итероны — повторяющиеся последовательности нуклеотидных остатков в ДНК.

Каллус — масса недифференцированных клеток, образующаяся при повреждении растения. Может образовываться из единичных клеток при их культивировании на искусственных средах.

Капсида — белковая оболочка вируса.

Кассета экспрессионная — фрагмент ДНК, содержащий все необходимые генетические элементы для экспрессии внедренного в него гена.

кДНК — однонитевая ДНК, синтезированная *in vivo* по РНКовой матрице с помощью обратной транскриптазы.

Клон — группа генетически идентичных клеток, возникших неполовым путем от общего предка.

Клонирование ДНК — разделение смеси рекомбинантных молекул ДНК путем их введения в клетки методом трансформации или инфекции. Одна бактериальная колония представляет собой клон, все клетки которого содержат одну и ту же молекулу рекомбинантной ДНК.

Клонирование клеток — их разделение путем посева на питательном агаре и получение колоний, содержащих потомство от изолированной клетки.

Кодон — тройка расположенных подряд нуклеотидных остатков в ДНК или РНК, кодирующая определенную аминокислоту или являющаяся сигналом окончания трансляции.

Компартментализация — ограничение процесса (продукта) определенной областью клетки.

Компетентность — способность клеток к трансформации.

Комплементарность (в генетике) — свойство азотистых оснований образовывать с помощью водородных связей парные комплексы аденин—тимин (или урацил) и гуанин—цитозин при взаимодействии цепей нуклеиновых кислот.

Конкатемерная ДНК — линейная ДНК, в которой некоторый элемент (например, фаговый геном) повторен несколько раз.

Контиг — группа из нескольких последовательно соединенных секвенированных участков ДНК.

Конъюгат — комплекс из нескольких ковалентно связанных молекул.

Конъюгация — способ обмена генетической информацией у бактерий, при котором вследствие физического контакта между клетками происходит перенос клеточной, плазмидной или транспозонной ДНК от донорной клетки в реципиентную.

Космида — вектор, содержащий *cos*-сайт ДНК фага λ .

Лектины — белки, связывающие углеводы.

Лигаза — фермент, образующий фосфодиэфирную связь между двумя полинуклеотидами.

Лиганд — молекула, распознаваемая специфической структурой, например, клеточным рецептором.

Лидерная последовательность — N-концевая последовательность секретируемых белков, обеспечивающая их транспорт через мембрану и отщепляющаяся при этом.

Лизис — распад клетки, вызванный разрушением ее оболочки.

Лизогения — явление носительства бактериальными клетками фага в виде профага (см. **профаг**).

Линия клеток — генетически однородные клетки животных или растений, которые можно выращивать *in vitro* в течение неограниченно долгого времени.

Линкер — короткий синтетический олигонуклеотид, применяемый для соединения фрагментов ДНК *in vitro*; обычно содержит участок узнавания определенной рестриктазой.

Липкие концы — комплементарные однонитевые участки ДНК, расположенные на концах молекул ДНК.

Липосомы — капельки жидкости, окруженные искусственной мембраной; искусственные липидные везикулы (см. **везикулы**).

Литическое развитие фага — фаза жизненного цикла фага, начинающаяся инфекцией клетки и завершающаяся ее лизисом.

Локус — участок ДНК (хромосомы), где расположена определенная генетическая детерминанта.

Маркерный ген — ген в рекомбинантной ДНК, кодирующий селективный признак.

Межвидовые гибриды — гибриды, полученные от слияния клеток, принадлежащих к разным видам.

Метаболизм — совокупность ферментативных процессов, обеспечивающих существование и воспроизведение клетки.

Метаболит — вещество, образующееся в химических реакциях живой клетки.

Метилазы — ферменты, присоединяющие метильную группу к определенным азотистым основаниям в ДНК.

Миниклетки — клетки, не содержащие хромосомной ДНК.

Модификация биополимера — изменение его структуры.

Моноклональные антитела — антитела с определенной специфичностью, синтезируемые гибридомами (см. **гибридомы**).

Морфогенез — осуществление генетической программы развития организма.

Мутагены — физические, химические или биологические агенты, увеличивающие частоту возникновения мутаций.

Мутагенез — процесс индукции мутаций.

Мутация — изменение генетического материала, часто приводящее к изменению свойств организма.

Ник — однонитевой разрыв в дуплексе ДНК с образованием 3'-ОН- и 5'-р-концов; ликвидируется ДНК-лигазой (см. **ДНК-лигаза**).

Нитрогеназа — фермент, осуществляющий фиксацию атмосферного азота.

Нуклеазы — общее название ферментов, расщепляющих молекулы нуклеиновых кислот.

Обратная транскриптаза — фермент, катализирующий реакцию синтеза ДНК по РНКовой матрице.

Олигонуклеотид — цепь, состоящая из нескольких (от 2 до 20) нуклеотидных остатков.

Онкогены — гены, чьи продукты обладают способностью трансформировать эукариотические клетки так, что они приобретают свойства опухолевых клеток.

Онкорнавирус — РНК-содержащий вирус, вызывающий перерождение нормальных клеток в раковые; содержит в своем составе обратную транскриптазу.

Оператор — регуляторный участок гена (оперона), с которым специфически связывается репрессор (см. **репрессор**), предотвращая тем самым начало транскрипции.

Оперон — совокупность совместно транскрибируемых генов, обычно контролирующих родственные биохимические функции.

Плазмида — кольцевая или линейная молекула ДНК, реплицирующаяся автономно от клеточной хромосомы.

Полилинкер — синтетический олигонуклеотид, содержащий участки узнавания для нескольких рестриктаз (см. **рестриктаза**).

Полимеразы — ферменты, ведущие матричный синтез нуклеиновых кислот.

Полипептид — полимер, состоящий из аминокислотных остатков, связанных пептидными связями.

Праймер — короткая олиго- или полинуклеотидная последовательность со свободной 3'ОН-группой, комплементарно связанная с одной из цепей ДНК или РНК; с его 3'-конца ДНК-полимераза начинает наращивать полидезоксирибонуклеотидную цепь.

Прокариоты — организмы, у которых нет клеточного ядра.

Промотор — регуляторный участок гена (оперона), к которому присоединяется РНК-полимераза с тем, чтобы начать транскрипцию.

Протоонкогены — нормальные хромосомные гены, от которых произошли онкогены, содержащиеся в некоторых ретровирусах.

Протопласт — растительная или микробная клетка, лишенная клеточной стенки.

Профаг — внутриклеточное состояние фага в условиях, когда его литические функции подавлены.

Процессинг — частный случай модификации (см. **модификация**), когда в биополимере уменьшается число звеньев.

Регулон — система генов, разбросанных по всему геному, но подчиняющихся общему регуляторному белку.

Рекомбинантная плаزمида — плазмида, содержащая фрагмент(ы) чужеродной ДНК.

Рекомбинантный белок — белок, часть аминокислотной последовательности которого кодируется одним геном, а часть — другим.

Рекомбинантная молекула ДНК (в генетической инженерии) — получается в результате ковалентного объединения вектора и чужеродного фрагмента ДНК.

Рекомбинация гомологическая — обмен генетическим материалом между двумя гомологичными молекулами ДНК.

Рекомбинация сайт-специфическая — объединение путем разрыва и слияния двух молекул ДНК или участков одной молекулы, происходящее по определенным сайтам.

Рекомбинация *in vitro* — операции *in vitro*, приводящие к созданию рекомбинантных молекул ДНК.

Ренатурация — восстановление исходной пространственной структуры молекул.

Репарация ДНК — исправление повреждений молекулы ДНК, восстанавливающее ее первоначальную структуру.

Репликация — процесс удвоения молекул ДНК или геномных вирусных РНК.

Репликатор — участок ДНК, ответственный за инициацию репликации.

Репликон — молекула ДНК или ее участок, находящиеся под контролем репликатора.

Репрессия — подавление активности генов, чаще всего путем блокирования их транскрипции.

Репрессор — белок или антисмысловая РНК, подавляющие активность генов.

Рестриктазы — сайт-специфические эндонуклеазы, составляющие часть системы рестрикции-модификации.

Рестрикты — фрагменты ДНК, образовавшиеся после ее гидролиза рестриктазой.

Рестрикционный анализ — установление мест расщепления ДНК рестриктазами.

Рестрикционная карта — схема молекулы ДНК, на которой указаны места разрезания ее различными рестриктазами.

Ретровирусы — РНК-содержащие вирусы животных, кодирующие обратную транскриптазу и образующие провирус с хромосомной локализацией.

Рецессивность — неучастие аллеля в формировании признака у гетерозиготной клетки.

Рибонуклеазы (РНКа́зы) — ферменты расщепляющие РНК.

Сайт — участок молекулы ДНК, белка и т.п.

Секвенирование — установление последовательности звеньев в молекулах нуклеиновых кислот или белков (полипептидов).

Селективные среды — питательные среды, на которых могут расти лишь клетки с определенными свойствами.

Септум — структура, образующаяся в центре бактериальной клетки в конце цикла деления и разделяющая ее на две дочерние клетки.

Скрининг — поиск в рассевах клеток или фагов тех колоний, которые содержат рекомбинантные молекулы ДНК.

Слитый белок (полипептид) — белок, образованный слиянием двух различных полипептидов.

Спейсер — в ДНК или РНК — некодирующая последовательность нуклеотидов между генами; в белках — аминокислотная последовательность, связывающая соседние глобулярные домены.

Сплайсинг — процесс формирования зрелой мРНК или функционального белка путем удаления внутренних частей молекул — интронов у РНК или интронов у белков.

Соматические гибриды — продукт слияния неполовых клеток.

Соматические клетки — клетки тканей многоклеточных организмов, не относящиеся к половым.

Суперпродуцент — микробный штамм, нацеленный на синтез определенного продукта в высокой концентрации.

Трансдукция — перенос фрагментов ДНК с помощью бактериофага.

Транскрипт — продукт транскрипции, т. е. РНК, синтезированная на данном участке ДНК как на матрице и комплементарная одной из его нитей.

Транскрипта́за обратная — фермент, синтезирующий по РНК как по матрице комплементарную ей однонитевую ДНК.

Транскрипция — синтез РНК на ДНК-матрице; осуществляется РНК-полимеразой.

Трансляция — процесс синтеза полипептида, определяемый матричной РНК.

Транспозон — генетический элемент, реплицируемый в составе реплика и способный к самостоятельным перемещениям (транспозиции) и интеграции в разные участки хромосомной или внехромосомной ДНК.

Трансфекция — трансформация клеток с помощью изолированной вирусной ДНК.

Трансформация — изменение наследственных свойств клетки, вызванное поглощенной ДНК.

Трансформация (в молекулярной генетике) — перенос генетической информации посредством изолированной ДНК.

Трансформация (онкотрансформация) — частичная или полная дедифференцировка клеток, вызванная нарушением регуляции роста клеток.

Умеренный фаг — бактериофаг, способный лизогенизировать клетку и в виде профага находится внутри бактериальной хромосомы или в плазмидном состоянии.

Фактор F (фактор фертильности, половой фактор) — конъюгативная F-плазида, найденная в клетках *E. coli*.

Фенотип — внешнее проявление свойств организма, зависящих от его генотипа и факторов окружающей среды.

Химеры — в контексте книги — лабораторные гибриды (рекомбинанты).

Центромера — локус на хромосоме, физически необходимый для распределения гомологичных хромосом по дочерним клеткам.

Штамм — линия клеток (или вирусов), ведущая начало от одной клетки (или вируса).

Шайн-Далгарно последовательность — участок прокариотической мРНК, необходимый для посадки на нее рибосом и ее правильной трансляции. Содержит последовательность нуклеотидов, комплементарную 3'-концу 16S рибосомной РНК.

Экзон — сохраняющаяся при сплайсинге часть интронированного гена.

Эксонуклеаза — фермент, гидролизующий фосфодиэфирные связи с концов ДНК.

Эксплантат — выделенный из организма материал какой-либо ткани.

Экспрессия гена — процесс реализации информации, закодированной в гене. Состоит из двух основных стадий — транскрипции и трансляции.

Электрофорез — разделение электрически заряженных полимеров в электрическом поле. Обычно ведется в гелях (гель-электрофорез), чтобы зоны разделяемых молекул не размывались тепловым движением.

Эндонуклеаза — фермент, гидролизующий фосфодиэфирные связи внутри нити ДНК.

Энхансер — регуляторный участок ДНК, усиливающий транскрипцию с ближайшего к нему промотора.

Эукариоты — организмы, клетки которых содержат ядра.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Автордиография 241, 280-282, 284, 285, 291, 305
- Агроинфекция 380
- Адаптеры 249-251
- Аденовирусы 404, 405, 423, 424
- Аминокислоты необычные (опины) 75, 376
- Ампликон 144
- Амплификация 161, 196, 212, 271, 277, 281, 282, 362
- Антигены 75, 101, 147, 148, 157-159, 283, 284, 286, 364, 401, 441, 447, 448
- Антитела 12, 13, 35, 148, 149, 283, 284, 286, 333, 335, 336
- Аттенуатор 24, 25, 318
- Бакуловирусы 405, 406
- Бактерии, общая характеристика 129-131
- *Agrobacterium risogenes*, носительство Ri-плазмид 94
 - *Agrobacterium tumefaciens*, носительство Ti-плазмид 91-94
 - *Bacillus subtilis*, векторы, трансформация 231-236
 - *Borrelia burgdorferi*, линейность хромосомы и плазмид 96, 97, 130
 - *Escherichia coli*, характеристика генома 131-133
 - *Pseudomonas*, плазмиды 68
 - векторы 230, 231
 - *Salmonella typhimurium*, гибриды с *E. coli* 438
 - *Streptomyces*, векторы 236-238
- Бактериофаг 21 119, 133, 210
- 434 119, 206, 211
 - f1 75, 124, 210, 222
 - f2 75
 - fd 337
 - M13 103, 124, 125, 213, 216, 260, 337, 460
 - MS2 75
 - Mu 41, 46-49, 52, 61-64, 82, 103, 115, 122, 123, 128, 228
 - N15 119-121, 126, 128, 286, 434
 - P1 110, 121-123, 126, 133, 157, 197, 271, 273, 275, 377, 434
 - P2 107, 108, 159
 - P4 126
 - P22 119, 133, 437, 438
 - R17 25
 - SP02 339
 - ф80 113, 114, 116, 120, 126, 210, 286, 434-437
 - F105 234
 - фX174 26, 258
 - λ, генетическая карта 104-106, 435
 - гибриды с фагом P22 437, 438
 - гибриды с фагом ф80 435-437
 - репликация ДНК 107
 - промоторы 106, 109, 118
 - сборка *in vitro* 190, 212, 213

-- репрессор 109, 110, 118
 -- фаговый дисплей 337, 338
 -- функциональная структура генома 434-437
 -- Int-система 109, 110, 114, 119

Банки (библиотеки) генов бактерий 272, 276

-- дрожжей 356, 359
 -- представительность 269, 270, 273, 278
 -- скрининг 271, 279-288
 - геномные 268-276
 - кДНК 277-279

Белковая инженерия 440, 443-448

Белки, агрегация внутриклеточная 323-326

- гибридные, конструирование 443-446
 - модификация 314, 326, 390, 443

- секреция 190, 191, 197, 201, 231, 326-329, 352

- слитые 331, 443
 - специфическое расщепление 333-335

- суперпродукция 201
 - чужеродные, нестабильность 315, 363

Биодеградация 75, 229, 347, 442

Блотинг 294, 296, 458, 465-467

Бреши (в ДНК) 183, 185, 246, 249, 252, 253, 264, 278

Вакцины 12, 447, 448

Везикулы 364, 366

Вектор вирусный SVGT1 397, 398

-- SVGT5 397, 398

- плазмидный pACYC177 200, 201

-- pAd10 224, 225

-- pAd10sacBII 275, 276, 312

-- pAL4404 377, 378

-- pAMH104 370, 371

-- pAS1 332, 335, 336

-- pAT153 197, 198, 406

-- pBAC108L 227, 267

-- pBin19 377

-- pBlueBacHis2 405, 406

-- pBR322 175, 188, 195-198, 200, 203, 218, 225, 233, 237, 239, 243, 286, 329, 331, 335, 336, 343, 355, 357, 367, 375, 376, 393, 399, 406, 418

-- pBR325 197

-- pDEL-BAC 266, 267

-- pDELTA-I 266, 267

-- pFRL4 365, 366

-- pFV-2 407

-- pGEM-1 202, 344

-- pGEM-2 202

-- pGMC 345

-- pGV1103 375, 376

-- pGV3850 375-377

-- pHP13 233, 234

-- pHP59 234

-- pHV11 232

-- pHV14 233

-- pJG28 376

-- pJP181 377, 378

-- pIJ486 237

-- pIJ702 237

-- pJJ10 233

-- pJJS1002 348, 349

-- pJJS1010 348, 349

-- pKT231 230

-- pKT249 231

-- pLGV2381 383, 384

- pLX100 201
- pMB9 195, 196, 355
- pMC9 284
- pMGH 413
- pMMB22 347
- pMSG 407, 408
- pOK12 200
- pPCV701 387
- pPL608 232, 339, 347, 348
- pRB45 364
- pRK2501 230
- pSC101 193-196
- pSV2 406, 407
- pSV3 407
- pTA1529 332, 342
- pUC9 233
- pUC18 199, 231
- pUC19 199, 221, 222, 266, 370, 377, 378
- pUT/Km 228
- pXRD4043 266, 267
- πVX 287
- pYAC2 357, 358
- pYAC4 357
- pYAC5 357
- YCp50 354, 356
- YEp13 354
- YEpIPT 367
- YEpsec1 368
- YIp5 354, 355
- YRp17 354, 356
- терапевтический оптималь-
ный 431
- транспозонный mini-Tn5-
Km228
- pEMBL8 222
- фаговый M13mp11FX 321
- M13mp18 215
- M13mp19 215
- λ47.1 221
- λ2001 210, 211, 271, 276
- λCh4A 239, 373
- λEMBL3 211, 271, 274, 276
- λEMBL3A 287
- λEMBL4 276
- λDASH 210, 211, 292
- λFIX 271, 292
- λfoo 338
- λgt10 211
- λgt11 211, 279, 284, 336
- λgtWES 209, 221
- λORF8 211, 271, 279, 336
- фазмидный λpMYF131 210, 221, 271, 434
- λZAP 210, 211, 222, 279, 312, 336, 434
- Векторы бинарные 377, 378, 387
- вирусные растительные 379, 380
- животные 394-406
- дрожжевые 352-362
- интегративные 191, 369-371, 378
- коинтегративные 375-377
- космидные 217-221
- типа Lorist 271
- нестабильность 315, 360, 424
- одноклеточные 213-215
- плазмидные бактериальные 191-202
- животные 406-410
- pBAC 223
- pcDNA3.1 409, 410, 446
- pET 332, 336
- pFV
- pGEM 201, 202
- pPAC 223
- pPCφ1-3 331, 332
- pRSET 332, 335
- pRSV 408

- pSV 408
- pUC 198-200
- pUR 332-334
- pYAC 223
- Ri 378
- TAR 359-361
- Ti 375-378
- YAC 356, 357, 359-361
- YCp 356, 360
- YEp 355, 364
- YIp 354, 355
- YLp 356, 357
- YRp 355, 356
- прямой селекции 200, 201, 207, 208
- растительные 373-380
- ретровирусные 422, 423, 427, 428
- свойства 191, 192
- транспозоны 228, 229, 417, 418
- фагмиды 216-217
- Bluescript 216, 260, 261, 304
- pEMBL 216, 217, 304
- pUC118/119 216, 217
- фаговые 191-193, 205-215
- M13mp 214, 215, 304
- λ gt 208, 209
- внедрения 205, 206, 208, 209, 211
- емкость 207
- замещения 205, 206, 208, 209, 211
- хароны 209, 210
- челночные 191, 192, 229, 231, 238, 347, 352, 403, 404, 408
- экспрессионные 313, 319, 329-338
- *B. subtilis* 231-234
- *Streptomyces* 236-238
- Вирус аденоассоциированный AAV 424
 - гепатита В 419, 447
 - гриппа 432, 447
 - иммунодефицита человека 419, 447
 - лейкоза мышей Молони MLV 404, 422
 - мозаики костра BMV 380
 - мозаики цветной капусты CaMV 379, 384
 - опухоли молочной железы мыши MMTV 408
 - осповакцины 96, 400, 401, 405
 - папилломы быка BPV 408, 409
 - простого герпеса 412, 424
 - саркомы Рауса 399, 408, 428
 - табачной мозаики TMV 380
 - Эпштейна-Барр EBV 409, 419
 - ядерного полиэдроза
- AcMNPV 405
 - SV40 344, 390, 395-400, 408, 409, 411
- β -Галактозидаза 22, 44, 198, 214, 234, 338, 340, 365
- Галл корончатый 91, 94, 373, 384
- Геном, анализ структуры 470, 471
 - полный сиквенс 309, 310, 351
- Геномная дактилоскопия 459, 460
 - инженерия бактерий 438, 439
 - бактериофагов 434-438
 - плазмид (фазмид) 434
 - растительных клеток 141, 439
- Геномное конструирование, принципы 433, 434
- Генная терапия 389, 418-431
- Гены, направленный мутагенез 257-264

- перекрывание 26, 27
- присоединение к векторам 242-254
- прокариот, регуляция экспрессии 20-25
- репортеры 229, 385-391
- синтез 254-257
- терапевтические 422-424, 428-431
- чужеродные, оптимизация экспрессии 315
- экспрессия в бактериях 315-329, 338-346
- экспрессия в дрожжах 363-368
- экспрессия в растениях 384-388
- экспрессия функциональная 352, 365
- эукариот, строение 27, 28
- Гибридизация ДНК вычитательная 283
- Гибридомы 146-148
- Гибриды бактериальные 438, 439
- соматические животных клеток 142-148, 361
- растительных клеток 141, 142
- Грибы мицелиальные 352, 369-371
- Дактилоскопия геномная 459, 460
- Дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (терминальная) 251
- Делеции, образование набора 264-267
- Диагностика наследственных заболеваний 454-459
- Дисплей фаговый 336-338, 447
- ДНК, гетеродуплексы 62, 260, 264
- делеции 57, 155, 156, 264-267
- дубликации 39, 47, 50, 53, 57, 155, 158
- инверсии 13, 38, 57, 117, 118, 122-124, 156-158
- инвертированные повторы 24, 38, 39, 44-46, 49-51, 53, 58, 60, 65, 96-99, 122, 158, 228, 266
- комплементарная (кДНК) 178, 183, 211, 221, 222, 243, 247, 277-280, 283, 339, 364, 368, 370, 384, 398, 413, 430
- -- синтез 181-183
- рекомбинантные
- нестабильность 214, 219, 231, 233, 234, 254, 267, 276, 348-350
- схемы конструирования 242-254
- репликативная форма 107, 124, 125, 214
- рестрикционные карт 288-293
- рестрикционный анализ 293-300
- способы фрагментирования 241
- эгоистическая 155, 158, 159
- ДНКазы I (панкреатическая) 185, 308
- ДНК-вакцины 447, 448, 460
- ДНК-лигаза фага T4 174, 175, 220, 227, 242, 247, 250, 256, 265, 279
- ДНК-носитель 383, 391, 392
- ДНК-полимераза I 67, 86, 95, 132, 176, 177, 252, 264, 271, 303
- кленовский фрагмент 177, 178, 246, 258, 304, 342
- III 67, 86, 91, 95, 121, 125
- РНК-зависимая 180-182

- фага T4 25, 179, 245
- фага T7 179, 180, 304
- Дрожжи *S. cerevisiae*, векторы 352-357
- дифференцировка клеток 134-138
- трансформация 362, 363
- экспрессия чужеродных генов в 363-368
- Ту-элементы 54, 55, 362
- Дуплекс ДНК-РНК 86, 87, 181, 183, 185, 278, 283
- РНК-РНК 87
- зонд-ген 282
- Защита биологическая 474, 475
- растений 449-451
- физическая 474, 475
- Зонд 161, 182, 183, 192, 202, 214-216, 221, 227, 238, 455, 456, 459, 472
- Индуктор 20, 23, 91, 199, 284
- Индукция профага 109, 110, 115, 123, 212, 213, 284
- Инсерции 44, 89, 117, 158, 257
- Интегроны 59, 60
- Интеины 36
- Интерфероны 325
- Интроны 27-29, 31-36, 51, 54, 56, 61, 258, 268, 271, 277, 399, 403, 408
- Каллус 139, 140, 142, 374, 375, 380
- Кассета экспрессионная 314, 384, 399, 400, 405, 408, 409, 423, 450
- Клетки бесплазмидные 70-73, 77, 83, 84, 91, 102, 350
- животных бессмертные 142, 143
- зародышевые, введение генов в 410-413
- костного мозга 426, 427
- растительные, регенерация растений из 138-142
- стволовые эмбриональные 414-417
- COS 400, 407
- Клетки-хозяева 68, 89, 95, 101, 122, 123, 230, 400, 403, 404, 434
- Клеточная инженерия 138-142
- Клонирование генов тотальное (шот-ган) 241, 268
- животных 148, 149
- ВАС 226, 227
- РАС 225, 226
- TAR 359-361
- YAC 357-359
- Код генетический 14, 155
- Кодоны, оптимальность состава 155, 315, 321-323, 364
- Коинтеграаты (плазмид) 69, 70, 72, 73, 77, 82, 89, 90, 375, 384
- Конкатемеры 107, 109, 122, 206, 217, 242, 383
- Коннекторы 251-254, 272, 398
- Контиги 300, 308, 309, 311
- Конъюгат 428
- Конъюгация 47, 62, 68-70, 75, 76, 79, 82, 84, 87, 90, 101, 102, 110, 113, 116, 152, 153, 229, 230
- Космида c2RB 220, 271
- pWE15 292
- pWE16 292
- Космиды 217-221
- Лигаза, см. ДНК-лигаза
- Лиганд 428
- Линкеры 161, 246-251, 254, 262, 267, 273, 279

- пептидные 338
- Липосомы 202, 363, 382, 420, 421, 429
- Маркеры активности (tag) 333
- дрожжей 353, 354
- животных клеток 143-145, 390, 391
- растительных клеток 374, 376, 384
- Метилазы специфические 171, 172
- Метод ПДРФ 269, 294-297, 455-459
- Микроинъекция генов в ядра 382, 393, 412
- Мини-мюдукция 64
- Минисателлиты 296, 459
- Миобласты 144, 424-426
- Мутагенез сайт-специфический 258-262
- сегмент-специфический 262-264
- спонтанный культивируемых растительных клеток 141
- Мушка *Drosophila*, гибридный дисгенез 50, 51
 - транспозоны FB 51, 52
 - Р-элементы 50, 51
- Нематода *Caenorhabditis elegans* 309, 310
- Ник-трансляция 177, 264, 278, 312
- Нуклеаза из проростков золотистой фасоли 184
 - Bal31 184
 - S1 182-184, 245, 247, 253, 257, 258, 264, 265, 267, 278, 280, 336, 344
- Нуклеазы 183-185
- Обратная генетика 457-459
- Олигонуклеотиды, синтез 254-257
- Онкогены 31, 53, 54, 64, 404, 410, 427
- Операторы 20-24, 109, 158
- Опероны 22-26, 28, 107, 109, 112-116, 318
- Оптимизация экспрессии генов 347, 363
- Палиндром 52, 132, 165-167, 172, 272
- Пептид сигнальный 191, 327-329, 342, 367, 368
- Перестройки геномные 155-158
- Пикорнавирусы 423
- Плаزمид ColE1 71, 85-87, 101, 195, 196, 200, 267, 276, 349, 355, 376
 - F 45, 68, 69, 75-84, 89, 90, 101, 122, 126, 160, 214, 223, 226, 227, 271
 - F' 79-82
 - F' lac 80, 112
 - N15 96, 97, 226
 - P1 77, 83, 84, 223-227
 - p15A 196, 206
 - p15B 124, 157
 - pAM β 1 234
 - pC194 95, 232
 - pE194 95, 232
 - pEKA28 90
 - pIJ101 236
 - pKN402 348
 - pMB1 196
 - pRK2 388
 - pRK252 378
 - pT127 232
 - pT181 95

- pTA1060 233
- pTB19 234
- pTiC58 373, 375, 384
- pTiAch5 373
- pUB110 94, 95, 232, 233
- R1 83-85, 89
- Rldrd19 196
- R6K 229
- R64drdII 376
- R67 376
- R100 83-85
- RK2 87-90
- RP4 68, 89, 101, 229, 230
- RSF1010 87, 88, 90, 101, 230, 347, 377, 378
- RSF2124 196
- Sa 230
- SCP2 236
- SLP1 236
- 2-микронная 97-99, 353, 355, 367
- Плазмиды интегративные, см. Эписомы
- Эписомы
 - конъюгативные 68-70, 82, 83, 91
 - копияность 70, 89, 99, 319
 - линейные 96, 97, 101, 126, 127, 226
 - мобилизация 68, 69, 87, 91, 101, 229
 - мультикопийные 67, 72
 - несовместимость 69-71, 75-77, 83-85, 87, 94, 97, 113, 230
 - низкокопийные 67, 71
 - ослабленный контроль репликации 67, 71
 - поверхностное исключение 70, 71
 - свойства 66-75
 - стабильность 70-74
 - строгий контроль репликации 67
 - широкий круг хозяев 68, 87-91
 - run-away 71, 319, 348
 - Ri 373
 - Ti 91-94, 101, 102, 373-375, 385
 - T-ДНК 91-95, 373-378, 387, 388
 - Полилинкеры 192
 - векторов M13mp18/19 199
 - Полимераза поли(A) 183
 - Taq 180, 304, 307
 - Полинуклеотидкиназа фага T4 186, 187, 255, 303, 305
 - Последовательность полигистидиновая 332, 334, 335, 405, 409, 446
 - Праймеры для векторов M13mp18/19 199
 - «Прогулка» по хромосоме 221, 273, 275, 292, 293, 298
 - Промоторы индуцибельные 317, 412
 - искусственные 318, 347
 - конститутивные 317
 - прокариот 17, 18, 316
 - сила 316, 317
 - фагоспецифические 183
 - эукариот 28-30, 363
 - Протопласты бактериальные, трансформация 202
 - слияние с животными клетками 394
 - дрожжей, трансформация 362, 363
 - растительные, слияние 139, 140
 - трансформация 381-383, 388
 - Профаги дефектные 119, 123, 124, 133, 157

- Процессинг белков 34, 53,
343, 370
- пре-мРНК 32-36
«Прыжки» по хромосоме
298, 299
Псевдогены 28, 57
ПЦР 176, 260, 417, 444, 455,
467-469
- Регулон 22, 23
Рекombинация гомологичес-
кая 38, 41, 57, 62, 63, 72, 78, 82,
107, 114, 116, 122, 133, 152, 153,
203, 234, 287, 355, 405, 416
-- внутримолекулярная 79,
118, 254, 417
- сайт-специфическая 36, 41,
46, 60, 72, 78, 98, 99, 113, 114, 116,
118, 155
-- внутримолекулярная 118
Репликатр плазмидный 192,
196, 200, 208, 217, 221, 222, 225, 228,
231, 233, 237, 267
- эукариотический 353, 355, 369
Репликация, инициация 67,
75, 76, 78, 86, 87, 89, 94, 99, 107,
124, 125, 132, 134, 222
- сигма-форма 66, 107, 108, 122
- тета-форма 66, 91, 96, 99,
107, 122, 131, 234
Репликоны, коинтеграция 60,
69, 70, 72, 73, 77, 89, 90, 117
Репрессор лактозный 23, 198,
214, 225, 284, 318, 348
- λ CI, CI857 109, 110, 118,
208, 317, 319, 336
Рестриктазы, изошизомеры
167-169, 172-174, 242, 267
- классы 164
- условия реакции 169-171
Рестрикция и модификация
151, 152
Ретровирусы 46, 49, 52-57,
64, 103, 402-404, 413, 414
Ретрогены 52, 56, 57
Ретропозоны *coria* 55
- gipsy 55
- Jockey 56
- LINES 56, 359
- mdg1 55
- Ту 54, 55, 362
Ретротранспозоны 49, 52-57
Рибонуклеаза H 182, 185
Рибосомы 19, 20, 22, 25, 27,
36, 37, 129, 134, 339
РНК матричная (мРНК) про-
кариот, синтез 17-19
--эукариот, образование 32-36
- рибосомная (рРНК) 14, 20,
28, 134, 182
- транспортная (тРНК) 14,
28, 52, 134, 156, 255, 256
РНК-полимераза фага T3 183
- фага T7 183, 335, 336, 345, 409
- фага SP6 183
- Сайленсеры 385, 386
Сайты полиаденилирования
мРНК 32
- посадки рибосом (RBS) 19,
20, 320, 329, 335
— внутренние (IRES) 423
- рестрикции, картирование
288-293
- связывания рибосом (SD-
сайты) 20, 27, 36, 37, 237, 314, 315,
320, 321, 323, 330, 335, 339, 340,
344, 345
Секвеназа 180, 304
Секвенирование генов, хими-
ческий метод 301-304

- полимеразное копирование 304-307
- стратегия 307-309
- геномов 309-312
- Секреция белков, механизм 326-328
- чужеродных 316, 342, 366-368
- Скрининг клонов, генетический метод 286
- иммунологические методы 280, 283-286, 336
- метод гибридизации колоний 280-283
- рекомбинационный метод 287-288
- Слияние транскрипционное 385, 386
- трансляционное 385, 386
- Соматостатин 339, 340
- Спейсеры 124, 213, 214, 322
- Сплайсинг 32-36, 384, 399, 402
- альтернативный 34, 35, 397
- полипептидов 36
- Суперпродукенты 316, 348-350
- Сферопласты, см. Протопласты
- Теломеры прокариотические 96, 97
- эукариотические 134, 353, 356
- Терминаторы транскрипции внутригенные 316, 318
- прокариот, строение 18, 19
- эукариот, строение 32
- трансляции 20
- Трансгенные животные, получение 410-418
- Трансгенные растения 372, 375, 376, 382, 384, 441, 449, 452
- Трансгеномы 392
- Трансдукция общая 64, 103, 117, 122, 133
- специфическая 103, 110, 114
- Транскрипт, стабилизация 321
- Транскриптаза обратная 52, 53, 56, 57, 61, 163, 180-182
- Транскрипция, инициация 20, 28, 36
- регуляция 20-26, 31, 32
- эффективность 314-316
- Трансляция, инициация 32, 37
- сопряженная 335, 345
- эффективность 314, 320, 322, 330, 364
- Транспозон мини-Mu 62-64
- Mu 41, 46-49, 52, 61-63, 82, 103, 115, 122, 123, 128, 228
- Tn2 49
- Tn3 44-46, 61, 117, 158, 196, 200
- Tn4 49
- Tn5 44, 45, 49, 61, 62, 146, 228, 376
- Tn9 44, 197, 376
- Tn10 44, 45, 48, 115, 118, 133, 228
- Tn402 47, 59, 60
- Tn501 46, 61
- Tn551 61
- Tn601/903 231, 376
- Tn903 44, 200
- Tn916 47
- Tn1000 45, 78, 266
- Tn1721 46
- Tn5041 45
- Tn5053 47, 60
- Транспозоны бактериальные, концевые повторы 39
- конъюгативные 47
- свойства 38
- специфичность интеграции 48, 49

- типы 41
- частота транспозиции 49
- биологическая роль 57-61
- использование 61-64
- механизм транспозиции 39-41
- эукариотические классичес-
кие 49-52
- FB 51, 52
- Трансфекция 110, 189, 203,
212, 214, 259
- Трансфераза терминальная
185, 186, 253
- Трансформация *B. subtilis*
234-236
 - *E. coli* 202-205
 - дрожжей 362, 363
 - животных клеток 390-394
 - ускоренными микрочасти-
цами 383
 - природная у растений 91-94,
 - растительных клеток 380-383
- Фаги лямбдоидные 118-121
 - нитевидные 124, 125
 - трансдуцирующие необыч-
ные 112-116
- Фагмиды 216, 217, 222, 238
- Фазмиды 121, 125-128, 208,
221, 238, 239, 271
- Фитогормоны 139, 374, 375
- Фосфатаза щелочная 186,
187, 206, 219, 225, 227, 244, 245,
286, 303, 329, 342
- Химеры животные 149, 150,
414, 417
 - молекулярные 161
- Хромосомы, элиминация в
соматических гибридах 145
- Центромеры 134, 353, 356
- Цитомегаловирус 409
- Экзоны 27, 34, 50
- Экзонуклеаза III 184, 185,
252, 260, 264, 265, 308, 344
 - фага λ 185, 251
- Экспрессия генов тканеспе-
цифическая 313, 385, 386, 389,
412, 430, 431
 - кратковременная 385, 389,
407, 408, 430
- Электропорация 189, 202-204,
227, 363, 382, 393
- Электрофорез в геле, прин-
цип метода 463-465
- Элементы инсерционные Ac 50
 - IS1 44, 49, 83, 117
 - IS2 44, 48, 58, 78, 80, 118
 - IS3 44, 46, 78
 - IS4 44, 48
 - IS5 44, 48
 - IS10 44, 45, 117, 118
 - IS50 44, 45, 48
 - IS101 46
 - IS903 44, 45
 - P 50, 51, 417, 418
- Эмбрионы гибридные 149, 150
- Эндонуклеазы специфичес-
кие, см. Рестриктазы
- Энхансеры транскрипцион-
ные 29, 31, 32, 37, 53, 54, 124,
385, 386, 396, 399, 408, 430
 - трансляционные 320, 345
- Эписомы 68, 75
- Эпитопы 335, 405, 409, 446, 447

ОГЛАВЛЕНИЕ

От автора	3
-----------------	---

Введение	7
----------------	---

ЧАСТЬ I. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ IN VIVO	13
--	----

Глава 1. ГЕНЫ	14
----------------------------	----

Гены прокариот (16). Транскрипция. Трансляция. Регуляция. **Гены эукариот (27).** Строение. Транскрипция. Регуляция. Формирование транскрипта. Сплайсинг. Трансляция. **Вопросы для повторения и обсуждения (37).**

Глава 2. ТРАНСПОЗОНЫ	38
-----------------------------------	----

Бактериальные транспозоны (39). Механизм транспозиции (39). Типы транспозонов (41). IS-элементы. Tn-элементы. Фаг Mu. Специфичность интеграции. Частота транспозиции. Число копий. **Эукариотические транспозоны (49).** Классические транспозоны (49). Контролирующие элементы кукурузы. Р-элементы. Транспозоны FB-семейства. **Ретротранспозоны (52).** Ретровирусы. Ретропозоны. Ретрогены. Роль транспозонов (57). Геномные перестройки. Мутации. Перенос генов. Реакция на стресс. **Применение транспозонов (61).** Вопросы для повторения и обсуждения (64).

Глава 3. ПЛАЗМИДЫ	65
--------------------------------	----

Общие свойства бактериальных плазмид (66). Репликация. Интеграция. Конъюгация. Мобилизация. Несовместимость. Поверхностное включение. Фенотипические признаки. Стабильность плазмид. **F-плазмида (75).** Генетика. Конъюгативность. Образование F'-плазмид. **R-плазмиды (82).** Плазмида ColE1 (85). Плазмиды с широким кругом хозяев (87). Плазмида RK2. Плазмида RSF1010. Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens* (91). Плазмиды грамположительных бактерий (94). Линейные плазмиды (96). 2-микронная плазмида дрожжей (97). Природная генная инженерия плазмид (99). Вопросы для повторения и обсуждения (102).

Глава 4. ФАГИ 103

Фаг λ (104). Генетика. Механизм лизогении. Получение необычных трансдуцирующих фагов. Перенос транспозонов и плазмид. **Фаги лямбдоидного семейства (118).** Фаг P1 (121). Фаг M13 (124). Эволюционные взаимоотношения плазмид и фагов (125). Вопросы для повторения и обсуждения (127).

Глава 5. КЛЕТКИ 129

Прокариотические клетки (130). Организация генома. Клетки *E. coli*. **Эукариотические клетки (134).** Дифференцировка клеток у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Клеточная инженерия растений. Соматическая гибридизация животных клеток. Клонирование животных. Животные химеры. **Перенос генов между видами (151).** Проблема рестрикции. Проблема репликации. Проблема рекомбинации. Проблема транскрипции. Проблема кодонов. **Геномные перестройки (155).** Делеции. Инверсии. Инсерции. Неконтролируемые геномные перестройки. Эгоистическая ДНК. Вопросы для повторения и обсуждения (160).

ЧАСТЬ II. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ IN VITRO 161

Глава 6. ФЕРМЕНТЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ 163

Ферменты рестрикции и модификации (163). Рестриктазы. Метилазы. ДНК-лигазы (174). Полимеразы (176). ДНК-полимераза I *E. coli*. Клевоуский фрагмент ДНК-полимеразы I. ДНК-полимераза фага T4. ДНК-полимераза фага T7. Таq-полимераза. ДНК-полимеразы Vent и Deep Vent. РНК-зависимая ДНК-полимераза. Поли(А)-полимераза. РНК-полимеразы фагов T3, T7 и SP6. **Нуклеазы (183).** Нуклеаза S1. Нуклеаза *Mung bean* из проростков золотистой фасоли. Нуклеаза Bal31. Экзонуклеаза III *E. coli*. Экзонуклеаза фага λ. Дезоксирибонуклеаза I. Рибонуклеаза H. **Другие ферменты (185).** Терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза. Щелочные фосфатазы. Полинуклеотидкиназа фага T4. Вопросы для повторения и обсуждения (187).

Глава 7. ВЕКТОРЫ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ В БАКТЕРИЯХ 188

Общая характеристика векторов (190). Классификация. Основные свойства. Дополнительные свойства. Плазмиды или фаги? **Системы клонирования в клетках *E. coli* (193).** Плазмидные векторы (193). Плаزمида pSC101. Плазмида ColE1. Вектор pBR322. Векторы pUC. Плазмида P15A. Векторы прямой селекции. Векторы pGEM. Трансформация клеток *E. coli*. **Фаговые векторы (205).** Векторы, сконструированные

на основе ДНК фага λ . Сборка фагов λ *in vitro*. Векторы, созданные на базе ДНК нитевидных фагов. **Гибридные векторы** (215). Фагмиды. Космиды. Фазмиды. **Векторы для клонирования больших фрагментов ДНК** (222). РАС-клонирование. Линейные векторы на базе плазмиды N15. ВАС-клонирование. **Векторы-транспозоны** (228). **Другие системы клонирования** (229). Векторы грамотрицательных бактерий. Векторы *Bacillus subtilis*. Трансформация клеток *B. subtilis*. Векторы *Streptomyces*. **Сравнительная характеристика векторов** (238). Вопросы для повторения и обсуждения (239).

Глава 8. ОПЕРАЦИИ НА ДНК 240

Подготовка фрагментов ДНК для клонирования (241). Объединение фрагментов ДНК (242). Непосредственное объединение. Ферментативная модификация концов. Использование линкеров. Использование адаптеров. Коннекторный метод. **Синтез олигонуклеотидов и генов** (254). **Направленный мутагенез** (257). Сайт-специфический мутагенез. Сегмент-специфический мутагенез. Образование делеций. **Вопросы для повторения и обсуждения** (267).

Глава 9. АНАЛИЗ ГЕНОВ И ГЕНОМОВ 268

Проблемы создания геномной библиотеки (269). Число клонов в банке. Векторы для клонирования. Выделение и фрагментация ДНК. Клонирование. Составление и хранение коллекции клонов. Банк кДНК. **Скрининг банка генов** (279). Метод гибридизации колоний. Иммунологические методы. Генетический метод. Рекомбинационный метод. **Физическое картирование ДНК** (288). Плазмидные и вирусные ДНК. Хромосомы. **Определение первичной структуры ДНК** (300). Химический метод. Метод полимеразного копирования. Анализ больших последовательностей. Секвенирование клеточных геномов. **Вопросы для повторения и обсуждения** (312).

ЧАСТЬ III. ЭКСПРЕССИЯ ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ 313

Глава 10. БАКТЕРИИ 315

Проблемы экспрессии чужДНК в бактериальных клетках (316). Уровень ДНК. Уровень РНК. Уровень белка. Подходы к конструированию экспрессионных векторов (329). Плазмидные векторы. Фаговый дисплей. Экспрессия прокариотических генов (338). Экспрессия эукариотических генов (339). Оптимизация экспрессии генов в других бактериальных системах (347). Суперпродуценты и проблема стабильности векторов (348). **Вопросы для повторения и обсуждения** (350).

Глава 11. ДРОЖЖИ 351

Векторы (352). Векторы типа YIp. Векторы типа YEp. Векторы типа YRp. Векторы типа YCp. Векторы типа YLp. Векторы типа YAC. YAC-клонирование. TAR-клонирование. Транспозонные векторы. **Трансформация дрожжей (362).** Экспрессия чужеродных генов в дрожжах (363). Экспрессия бактериальных генов. Экспрессия генов животных. Секреция белков. **Клонирование и экспрессия генов в мицелиальных грибах (369).** **Вопросы для повторения и обсуждения (371).**

Глава 12. РАСТЕНИЯ 372

Векторы (373). Т-ДНК как природные векторы. Маркеры. Коинтегративные векторы. Бинарные векторы. Бинарные векторы без Т-ДНК. Ri-векторы. Вирусные векторы. **Трансформация растительных клеток (380).** Трансформация агробактериями. Трансформация протопластов изолированной ДНК. Трансформация клеток и тканей изолированной ДНК. **Экспрессия чужеродных генов (384).** **Вопросы для повторения и обсуждения (388).**

Глава 13. ЖИВОТНЫЕ 389

Трансформация клеток (390). Культивируемые клетки. Селективные маркеры и гены-репортеры. Кальций-фосфатный метод. ДЕАЕ-декстрановый метод. Микроинъекция ДНК в ядра. Электропорация. Слияние протопластов. **Векторы (394).** **Вирусные векторы (394).** Вирус SV40. Векторы с замещением поздних генов SV40 ДНК. Экспрессионная кассета. Векторы с замещением ранней области SV40 ДНК. Вирус осповакцины. Ретровирусы. Аденовирусы. Бакуловирусы. **Плазмидные векторы (406).** Репликатор вируса SV40. Плазмиды без эукариотического репликатора. Репликатор вируса папилломы быка (BPV). Репликатор вируса Эпштейна-Барр (EBV). Современные векторы. **Введение генов в зародышевые клетки и получение трансгенных животных (410).** Микроинъекция ДНК. Инфицирование ретровирусами. Использование эмбриональных стволовых клеток. Использование транспозонов. **Введение генов в ткани и генная терапия (418).** **Генетические болезни человека и генная терапия (419).** **Проблемы генной терапии человека (420).** **Системы переноса генов (422).** Вирусный способ. Миобласты как клеточные векторы. Клетки костного мозга. Генная терапия рака. Рецептор-опосредованный перенос. Тканеспецифическая экспрессия терапевтических генов. Оптимальный терапевтический вектор. **Вопросы для повторения и обсуждения (431).**

<i>Глава 14. ГЕНОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ</i>	<i>432</i>
Принципы геномного конструирования (433). Бактериофаги (434). Одноклеточные организмы (438). Многоклеточные организмы (439). Вопросы для повторения и обсуждения (439).	
<i>Глава 15. МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ</i>	<i>440</i>
Белковая инженерия (443). Модификация белков. Конструирование гибридных белков. Искусственные белки. Вакцинные препараты. Микроорганизмы (448). Растения (449). Животные (452). Человек (454). Диагностика наследственных заболеваний. Геномная дактилоскопия. ДНК как медицинский продукт. Другие проблемы (460). Вопросы для повторения и обсуждения (462).	
ПРИЛОЖЕНИЕ	463
Гель-электрофорез (463). Блоттинг нуклеиновых кислот (465). Полимеразная цепная реакция (467). Компьютерные методы (470). Анализ структуры генома. Анализ структуры генов и белков. Дизайн гибридизационных зондов. Меры безопасности (473).	
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	476
СОКРАЩЕНИЯ	491
СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ	493
ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ	502

V.N. RYBCHIN

PRINCIPLES OF GENETIC ENGINEERING

CONTENTS

Preface	3
Introduction	7
PART I. GENE ENGINEERING IN VIVO	13
Chapter 1. GENES	14
Prokaryotic genes (16). Transcription. Translation. Regulation. Eukaryotic genes (27). Structure. Transcription. Regulation. Transcript formation. Splicing. Translation. Questions for review and discussion (37).	
Chapter 2. TRANSPOSONS	38
Bacterial transposons (39). Mechanism of transposition (39). Types of transposons (41). IS-elements. Tn-elements. Phage Mu. Specificity of integration. Frequency of transposition. Copy number. Eukaryotic transposons (49). Classical transposons (49). Controlling elements in maize. P-elements. Transposons of FB-family. Retrotransposons (52). Retroviruses. Retroposons. Retrogenes. A role of transposons (57). Genome rearrangements. Mutations. Gene transfer. Stress reaction. Application of transposons (61). Questions for review and discussion (64).	
Chapter 3. PLASMIDS	65
Basic properties of bacterial plasmids (66). Replication. Integration. Conjugation. Mobilization. Incompatibility. Surface exclusion. Phenotypes. Stability of plasmids). F-plasmid (75). Genetics. Transmissibility. Formation of F'-plasmids. R-plasmids (82). Plasmid ColE (85). Broad host-range plasmids (87). Plasmid RK2 . Plasmid RSF1010 . Ti-plasmids of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (91). Plasmids of Gram-positive bacteria (94). Linear plasmids (96). Yeast 2-μ plasmid (97). Natural gene engineering of plasmids (99). Questions for review and discussion (102).	
Chapter 4. PHAGES	103
Phage λ (104). Genetics. The mechanism of lysogeny. Construction of unusual transducing phages. Transfer of transposons and plasmids. Lambdoid	

phages (118). Phage P1 (121). Phage M13 (124). Evolutional relationship of plasmids and phages (125). Questions for review and discussion (127).

Chapter 5. CELLS 129

Prokaryotic cells (130). Genome organization. *E. coli* cells. **Eukaryotic cells** (134). Cell differentiation in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Cell engineering of plants. Somatic hybridization of animal cells. Cloning of animals. Animal chimeras. **Gene transfer between species** (151). A problem of restriction. A problem of replication. A problem of recombination. A problem of transcription. A problem of codons. **Genome reorganization** (155). Deletions. Inversions. Insertions. Uncontrollable genome reorganizations. Egoistic DNA. **Questions for review and discussion** (160).

PART II. GENE ENGINEERING IN VITRO 161

Chapter 6. ENZYMES OF GENETIC ENGINEERING 163

Enzymes of restriction and modification (163). Restrictases. Methylases. **DNA-ligases** (174). **Polymerases** (176). DNA-polymerase I of *E. coli*. Klenow fragment of DNA-polymerase I. DNA-polymerase of phage T4. DNA-polymerase of phage T7. Taq- polymerase. Vent and Deep Vent DNA-polymerases. RNA-dependent DNA-polymerase. Poly(A)-polymerase. RNA-polymerases of phages T3, T7 and SP6. **Nucleases** (183). Nuclease S1. Mung bean nuclease. Nuclease Bal31. Exonuclease III of *E. coli*. Exonuclease of phage λ . Deoxyribonuclease I. Ribonuclease H. **Other enzymes** (185). Terminal deoxynucleotidyl transferase. Alkaline phosphatase. Polynucleotidyl kinase of phage T4. **Questions for review and discussion** (187).

Chapter 7. VECTORS FOR CLONING IN BACTERIA 188

General description of vectors (190). Classification. The basic properties. Additional properties. Plasmids or phages? **Cloning systems in *E. coli*** (193). **Plasmid vectors** (193). Plasmid pSC101. Plasmid ColE1. Vector pBR322. Vectors pUC. Plasmid P15A. Vectors for direct selection. Vectors pGEM. Transformation of *E. coli* cells. **Phage vectors** (205). Vectors designed on a basis of λ DNA. Assembly of phages λ *in vitro*. Vectors, designed on a basis of DNA of filamentous phages. **Hybrid vectors** (215). Phagmids. Cosmids. Phasmids. **Vectors for cloning of large DNA fragments** (228). PAC- cloning. Linear vectors on the basis of plasmid N15. BAC-cloning. **Transposon vectors** (228). **Other systems of cloning** (229). Vectors of Gram-negative bacteria. Vectors of *Bacillus subtilis*. Transformation of *B. subtilis* cells. Vectors of *Streptomyces*. **The comparative characteristic of vectors** (238). **Questions for review and discussion** (239).

Chapter 8. DNA MANIPULATION 240

Preparation of DNA fragments for cloning (241). Ligation of DNA fragments (242). Direct ligation. Enzymatic modification of the DNA ends. Use of linkers. Use of adapters. A method of connectors. **Synthesis of oligonucleotides and genes (254).** **Site-directed mutagenesis (257).** Site-specific mutagenesis. Segment-specific mutagenesis. Formation of deletions. **Questions for review and discussion (267).**

Chapter 9. THE ANALYSIS OF GENES AND GENOMES 268

Problems of creation of a genome library (269). Number of clones in bank. Vectors for cloning. Isolation and fragmentation of DNA. Cloning. Preparation and storage of a clone collection. cDNA bank. **Gene bank screening (279).** Method of colony hybridization. Immunological methods. A genetic method. A recombination method. **Physical DNA mapping (288).** Plasmid and virus DNA. Chromosomes. **Determination of the primary DNA structure (300).** The chemical method. The method of polymerase copying. The analysis of large sequences. Sequencing of cell genomes. **Questions for review and discussion (312).**

PART III. EXPRESSION OF FOREIGN GENES 313

Chapter 10. BACTERIA 315

Problems of foreign DNA expression in bacterial cells (316). DNA level. RNA level. Protein level. **The approaches to designing of expression vectors (329).** Plasmid vectors. Phage display. **Expression of prokaryotic genes (338).** **Expression of eukaryotic genes (339).** **Optimization of gene expression in other bacterial systems (347).** Superproducing cells and the problem of vector stability (348). **Questions for review and discussion (350).**

Chapter 11. YEAST 351

Vectors (352). YIp vectors. YE_p vectors. YRp vectors. YC_p vectors. YLp vectors. YAC vectors. YAC-cloning. TAR-cloning. Transposon vectors. **Transformation of yeast (362).** **Expression of foreign genes in yeast (363).** Expression of bacterial genes. Expression of animal genes. Secretion of proteins. **Cloning and gene expression in filamentous fungi (369).** **Questions for review and discussion (371).**

Chapter 12. PLANTS 372

Vectors (373). T-DNA as natural vectors. Markers. Cointegrative vectors. Binary vectors. Binary vectors without T-DNA. Ri-vectors. Viral vectors. **Transformation of plant cells (380).** Agrobacterial transformation. Transformation of protoplasts by isolated DNA. Transformation of cells and tissue by isolated DNA. **Expression of foreign genes (384).** **Questions for review and discussion (388).**

Chapter 13. ANIMALS 389

Transformation (390). Cell cultures. Selective markers and reporter genes. Calcium phosphate method. DEAE-dextran method. Micro-injection of DNA in nuclei. Electroporation. Protoplast fusion. **Vectors** (394). **Viral vectors** (394). Virus SV40. Vectors with replacement of late genes of SV40 DNA. Expression cassette. Vectors with replacement of an early region of SV40 DNA. The vaccinia virus. Retroviruses. Adenoviruses. Baculoviruses. **Plasmid vectors** (406). SV40 replicator. Plasmids without eukaryotic replicator. Replicator of a bovine papillomavirus. Replicator of the Epstein-Barr virus. Modern vectors. **Introduction of genes into embryonic cells and producing of transgenic animals** (410). Micro-injection of DNA. Infection by retroviruses. Use of embryonic stem cells. Use of transposons. **Introduction of genes into tissue and gene therapy** (418). **Human genetic diseases and gene therapy** (419). **Problems of human gene therapy** (420). **Systems of gene transfer** (422). Viruses. Mioblasts as cell vectors. Bone marrow cells. Gene therapy of cancer. Receptor-mediated transfer. Tissue-specific expression of therapeutic genes. Optimal therapeutic vector. **Questions for review and discussion** (431).

Chapter 14. GENOME ENGINEERING 432

Principles of genome designing (433). **Bacteriophages** (434). **Unicellular organisms** (438). **Multicellular organisms** (439). **Questions for review and discussion** (439).

Chapter 15. MOLECULAR BIOTECHNOLOGY 440

Protein engineering (443). Modification of proteins. Designing of hybrid proteins. Artificial proteins. Vaccine preparations. **Microorganisms** (448). **Plants** (449). **Animals** (452). **Human** (454). Diagnostics of hereditary diseases. Genome dactyloscopy. DNA as a medical product. **Other problems** (460). **Questions for review and discussion** (462).

APPENDIX 463

Gel electrophoresis (463). **Blotting of nucleic acids** (465). **Polymerase chain reaction** (467). **Computer methods** (470). Analysis of genome structure. Structure analysis of genes and proteins. Design of hybridization probes. **Security measures** (473).

REFERENCES 476**ABBREVIATIONS** 491**GLOSSARY** 493**INDEX** 502

РЫБЧИН Валентин Николаевич

ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Редакторы: *М.А. Молчанова, А.В. Явственная, Н.В. Бакк*

Технический редактор *А.И. Колодяжная*

Корректор *М.Н. Стремилева*

Компьютерная верстка *О.В. Николаевой*

Художник *Т.П. Санькова*

Директор Издательства СПбГТУ *А.В. Иванов*

Лицензия ЛР №020593 от 07.08.97

Сдано в набор 15.01.98. Подписано в печать 08.02.2002. Формат 60×84/16.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 32,75. Уч.-изд. л. 32,75. Тираж 300. Заказ 78.

Санкт-Петербургский государственный технический университет
Издательство СПбГТУ, член Издательско-полиграфической
ассоциации вузов Санкт-Петербурга
Адрес университета и издательства:
195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29